

Combinatorial strategies for polymer synthesis**Publication number:** JP7506561T**Publication date:** 1995-07-20**Inventor:****Applicant:****Classification:**

- international: C07H21/04; B01J19/00; C07B61/00; C07H21/00;
C07K1/04; C07K1/06; C07K5/103; C07K5/107;
C07K7/06; C07K14/705; C12M1/34; C12N15/09;
G01N35/10; G01N37/00; C12N15/09; B01J19/00;
C07B61/00; C07H21/00; C07K1/00; C07K5/00;
C07K7/00; C07K14/435; C12M1/34; G01N35/10;
G01N37/00; (IPC1-7): C07K1/04; C07H21/04;
C07K5/103; C07K5/107; C07K7/06; C07K14/705

- European: B01J19/00C; C07B61/00L; C07H21/00C4; C07H21/00F;
C07K1/04B; C07K1/04C; G01N35/10M3; Y01N6/00

Application number: JP19920509567T 19921120

Priority number(s): WO1992US10183 19921120; US19910796243
19911122; US19920874849 19920424

Also published as:

WO9309668 (A1)
EP0624059 (A1)
US5677195 (A1)
JP2006194897 (A)
JP2003061657 (A)

more >>

Report a data error here

Abstract not available for JP7506561T

Abstract of corresponding document: **US5677195**

A method and device for forming large arrays of polymers on a substrate (401). According to a preferred aspect of the invention, the substrate is contacted by a channel block (407) having channels (409) therein. Selected reagents are delivered through the channels, the substrate is rotated by a rotating stage (403), and the process is repeated to form arrays of polymers on the substrate. The method may be combined with light-directed methodologies.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平7-506561

第3部門第2区分

(43)公表日 平成7年(1995)7月20日

(51)Int.Cl.⁴
 C 07 K 1/04
 C 07 H 21/04
 C 07 K 5/103
 5/107
 7/06
 識別記号 庁内整理番号
 8318-4H
 B 8615-4C
 ZNA 8318-4H
 F I

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 24 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平5-509567
 (86)(22)出願日 平成4年(1992)11月20日
 (85)翻訳文提出日 平成6年(1994)5月23日
 (86)国際出願番号 PCT/US92/10183
 (87)国際公開番号 WO93/09668
 (87)国際公開日 平成5年(1993)5月27日
 (31)優先権主張番号 796, 243
 (32)優先日 1991年11月22日
 (33)優先権主張国 米国 (US)
 (31)優先権主張番号 874, 849
 (32)優先日 1992年4月24日
 (33)優先権主張国 米国 (US)

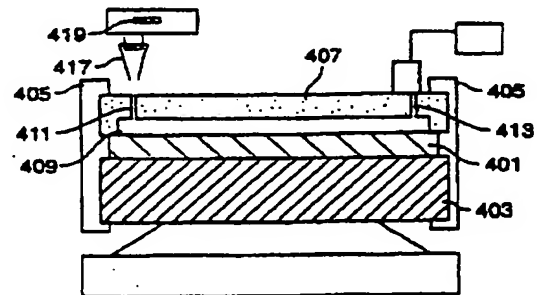
(71)出願人 アフィマックス テクノロジーズ ナーム
 ロゼ フェンノートシャップ
 オランダ領アンチル, クラカオ, デ リュ
 イデルカゼ62
 (72)発明者 ウィンクラー, ジェイムス エル
 アメリカ合衆国, カリフォルニア 94306,
 パロ アルト, アッシュ ストリート
 2140
 (72)発明者 フォダー, スティーブン ビー. エー.
 アメリカ合衆国, カリフォルニア 94303,
 パロ アルト, ネイザン ウェイ 3863
 (74)代理人 弁理士 石田 敬 (外3名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ポリマー合成に対する組合わせの戦略

(57)【要約】

基板(401)上にポリマーの大きなアレーを形成する方法と装置。本発明の好ましい態様では、基板を、チャネル(409)を有するチャネルブロック(407)と接触させる。選択された試薬を上記チャネルを通じて送りこみ、基板を回転台(408)で回転させ、次いでこの工程を繰返して基板上にポリマーのアレーを形成させる。この方法は先による方法を組合わせることができる。



請求の範囲

1. 複数の選択された領域を有する表面からなる単一の基板の上に、多数なモノマー配列を有するポリマーを形成する方法であって、下記ステップ：すなわち

(a) 前記表面に隣接して複数のチャンネルを形成し、そのチャンネルは少なくとも部分的に、前記の選択された領域の部分によって形成された壁を有し；

(b) 選択されたモノマーを前記チャンネルに入れ、前記の選択された領域の前記部分においてポリマーを合成し、前記の選択された領域の前記部分は前記の選択された領域中の少なくとも一つの他の領域内のポリマーと異なるモノマーの配列を有するポリマーを含有し；次いで

(c) 前記の選択された領域の第二の部分によって形成された前記チャンネルについてステップ(a)と(b)を繰返す；

ステップからなる方法。

2. 複数のチャンネルを形成する前記ステップが、前記表面に隣接してチャンネルブロックを配置するステップからなり、前記チャンネルブロックが、複数の前記の壁および前記フローチャンネルを少なくとも部分的に形成する前記表面を囲んでいる請求の範囲第1項記載の方法。

3. 選択された試薬を前記チャンネル中に入れるステップが、下記のステップ：すなわち

少なくとも第1チャンネルの活性部位から保護基を除去；

第一モノマーを、前記の少なくとも第一チャンネルを通じて、投入させ、前記第一モノマーが保護基を有し、前記第一モノマーを前記第一チャンネルの前記活性部位に結合させ；

少なくとも一つのチャンネルを通じて入れる；

ステップを含んでいる請求の範囲第3項記載の方法。

11. 選択された試薬を前記チャンネルに入れる前記ステップが、前記チャンネルと試薬で通過させてビレットを配置し；および前記選択された試薬を前記チャンネルを通じて注入する；ことからなる請求の範囲第1項記載の方法。

12. ビレットを前記チャンネルと試薬で通過させて配置する前記ステップが、前記ビレットを、前記基板の前記表面に対して反対側の面上のオリフィスと接触させて配置するステップである請求の範囲第11項記載の方法。

13. ビレットを前記チャンネルと試薬で通過させて配置する前記ステップが、複数のビレットを、複数の前記チャンネルと通過させて配置し、次いで異なる試薬を少なくとも二つの前記チャンネルを通じて投入させるステップである請求の範囲第11項記載の方法。

14. 前記表面のバルブのアレーを形成して試薬が前記表面の所定の場所に導入可能になり、次いで前記バルブを選択的に作動させ次に前記の選択された試薬を形成されたチャンネルを通じて投入させるステップが先行している請求の範囲第1項記載の方法。

15. 前記基板の部分に光を照射して、光触媒性基が前記基板上の活性基から除去されるステップが先行している請求の範囲第1項記載の方法。

16. 前記の選択された光照射部分がストライプの形態であり、かつチャンネルを形成する前記ステップが前記チャンネルを前記ストライプの端路にそって形成することを含み、異なる試薬が前記チャンネルの少なくとも一部の中に入れられる請求の範囲第15項記載の方法。

17. 単一の基板の表面上に複数のビレットの配列を形成する方法であって、下記のステップすなわち

少なくとも第二チャンネルの前記活性部位から保護基を除去し、前記第二チャンネルの少なくとも部分が、前記第一チャンネルが形成している前記基板の部分に隣接し；次いで

第二モノマーを前記の少なくとも第二チャンネルを通じて投入させ、前記第二モノマーを前記第二チャンネルの前記活性部位に結合させる；ステップからなる請求の範囲第1項記載の方法。

4. 前記ポリマーを、受容体との結合アフィニティーについてスクリーニングするステップをさらに有する請求の範囲第1項記載の方法。

5. 少なくとも10種の異なるポリマーを前記表面上に生成させる請求の範囲第1項記載の方法。

6. 少なくとも1,000種の異なるポリマーを前記表面上に生成させる請求の範囲第1項記載の方法。

7. 少なくとも10,000種の異なるポリマーを前記表面上に生成させる請求の範囲第1項記載の方法。

8. 前記ポリマーがオリゴヌクレオチドおよびペプチドからなる前記選択された領域の前記活性部位に結合する請求の範囲第1項記載の方法。

9. 前記の選択された領域が各々約10,000ミクロン²未満の面積を有する請求の範囲第1項記載の方法。

10. 除去および投入のステップがさらに、

チャンネルブロックを、第一方向に、前記表面と接触させて配置し、次いで第一モノマーを含有する物質を、前記チャンネルブロックの少なくとも二つのチャンネルを通じて入れ；

前記チャンネルブロックおよび前記基板のうちの一方を、残りの地方に対して回転し；次いで

チャンネルブロックを、第二方向に、前記表面と接触させて配置し、次いで第二モノマーを含有する物質を、前記チャンネルブロックの少

(a) 前記基板を、第一方向に、複数のチャンネルを有するチャンネルブロックと接触させて配列し；

(b) 少なくとも第一モノマーを、少なくとも一つの前記チャンネルを通じて投入させ、前記第一モノマーを前記表面の部分にキャプリングさせ；

(c) 少なくとも第二モノマーを、少なくとも一つの前記チャンネルを通じて投入させ、前記第二モノマーを前記表面の部分にキャプリングさせ；

(d) 前記チャンネルブロックを前記基板に対して回転させ、次いで前記基板を再び前記チャンネルブロックと接触させて配置し；

(e) 第三モノマーを少なくとも一つの前記チャンネルを通じて投入させて前記表面上に少なくとも第一と第二のペプチド配列を形成し；次いで

(f) 第四モノマーを少なくとも一つの前記チャンネルを通じて投入させて前記表面上に少なくとも第三と第四のペプチド配列を形成する；

ステップからなる方法。

18. 基板；

複数の溝を備えたチャンネルブロック；

前記チャンネルブロックを前記基板と結合させて保持する手段；

前記チャンネルブロックおよび前記基板のうちの一方を、残りの地方に対して平行移動させる手段；および

選択された試薬を前記溝に注入する手段；

からなる多数なポリマー配列を形成するのに用いるキット。

19. 前記基板が活性部位の保護基を有する請求の範囲第18項記載のキット。

20. さらに、前記保護基を除去するのに用いる保護基物質を有す

る請求の範囲第18項記載のキット。

21. 前記膜が前記チャンネルブロックの孔に装設され、前記孔が前記基板の背面を通過して延びている請求の範囲第18項記載のキット。

22. さらに、前記基板の選択された部分に光を照射して前記基板上の保護層を除去する手段を有し、前記保護層は先に暴露されると前記基板上の感光部位から除去される請求の範囲第18項記載のキット。

23. 光を照射する前記手段が光源と光マスクを有し、前記光マスクが前記光を通過しない領域および前記光を通過する領域を有する請求の範囲第22項記載のキット。

24. 前記注入手段がビベットからなる請求の範囲第18項記載のキット。

25. 前記ビベットが複数のビベットからなり、各ビベットが前記膜の異なる一つに取付けられている請求の範囲第24項記載のキット。

26. 単一の基板上で複数の反応を行う装置であって：
単一の基板上に存在し、各々別個の反応を行うことができる少なくとも約 100個の反応領域；

一つ以上の反応物をも一つ以上の反応領域に送り込む手段；および
少なくともいくつかの反応物が少なくともいくつかの反応領域と接触するのを防止する手段；
を有する装置。

27. 基板が複数の反応を有し、反応が前記装置内に保持されている請求の範囲第26項記載の装置。

28. 一つ以上の反応物を送り込む手段が基板に装設しているチャンネルブロックのフローチャンネルであり、および少なくともいくつかの反応物を閉じこめている手段がフローチャンネルの壁である請求の範囲第26項記載の装置。

反応領域から定期的に除去するステップを有する請求の範囲第35項記載の方法。

38. 第一モノマーを第一反応領域にカップリングさせ次いで第二モノマーを第二反応領域にカップリングさせ、その後追加のモノマーを、第一反応領域および第二反応領域に入れてカップリングさせる請求の範囲第35項記載の方法。

39. モノマー溶液を、電気泳動ポンプ、ビベットおよび荷電液体ディスペンサーからなる群から選択されるディスペンサーによって第一反応領域と第二反応領域に入れる請求の範囲第35項記載の方法。

40. 単一基板上の、複数の反応領域を有する化合物の非相同アレーを交換する方法であって：下記のステップすなわち

第一群の反応領域と第二群の反応領域を活性化し；
第一反応物を第一群の反応領域に送りこむが第二群の反応領域には送りこまず；

第一反応物を第一群の反応領域で反応させて第一非相同アレーを第二非相同アレーに交換し、その非相同アレーが約 100個を超える別個の反応領域を有する；

ステップからなる方法。

41. さらに、第一群の反応領域を第二群の反応領域から隔離するステップを有する請求の範囲第40項記載の方法。

42. 第一群の反応領域を、チャンネルブロックを基板に当接させて配置することによって隔離する請求の範囲第41項記載の方法。

43. 第一群の反応領域を、基板上の壁によって第二群の反応領域から隔離する請求の範囲第41項記載の方法。

44. 基板が、壁によって互いに隔離された反応領域を通過する一連の流れを有する請求の範囲第43項記載の方法。

45. 第一群の反応領域を、基板上の一つ以上の非連続領域によっ

29. 少なくともいくつかの反応物を閉じこめている手段が基板の表面上の隙水被覆である請求の範囲第28項記載の装置。

30. 内部に異なる化合物を有する約 100個より多い反応領域；および

反応領域を囲みかつ隙水被覆が反応領域より高い閉じこめ領域；を有する基板。

31. 閉じこめ領域が隙水被覆層を有する請求の範囲第30項記載の基板。

32. 保護層が充分分解性である請求の範囲第31項記載の基板。

33. 反応領域がチャンネルを形成する請求の範囲第30項記載の基板。

34. 基板が約1000個より多い反応領域を有する請求の範囲第30項記載の基板。

35. 閉じこめ領域に囲まれ、この領域より一つ以上のモノマー溶液によって流れ易い複数の反応領域を有する基板上に、多数なモノマー配列を有する複数のポリマーを形成する方法であって：

一つ以上のモノマー溶液を順に第一反応領域に入れて第一モノマー配列を有する第一ポリマーを形成し、そのモノマー溶液は同じこめ領域によって第一反応領域に閉じこめられ；次いで

一つ以上のモノマー溶液を順に第二反応領域に入れて第二モノマー配列を有する第二ポリマーを形成し、そのモノマー溶液は同じこめ領域によって第一反応領域に閉じこめられている；ことからなる方法。

36. モノマー溶液を第一反応領域に入れるステップが、ビベットを基板に対して移動し次いで少なくとも一つのモノマー溶液を第一反応領域に供給させることからなる請求の範囲第35項記載の方法。

37. さらに、選択されたモノマーを第一ポリマーと第二ポリマーにカップリングさせた後、モノマー溶液を、第一反応領域と第二反

て第二群の反応領域から隔離する請求の範囲第40項記載の方法。

46. 非相同アレーが約1000個を超える別個の反応領域を有する請求の範囲第40項記載の方法。

47. さらに、下記のステップ：すなわち

第二反応物を第二群の反応領域に送りこむが第一群の反応領域には送りこまず；

第二反応物を第二群の反応領域で反応させ；

第三群の反応領域を活性化させ、その第三群は第一群の反応領域と共通のいくつかの反応領域を有し；

反応物を第三群の反応領域に送りこむが第二群の反応領域には送りこまず；そして

反応を第三群の反応領域で起こさせる；

ステップを有する、請求の範囲第40項記載の方法。

明 細 書

ポリマー合成に対する組合わせの戦略

発明の背景

本発明は米国特許第 789, 848 号 (1981 年 11 月 22 日付付出版) および米国特許第 874, 849 号 (1982 年 4 月 24 日付付出版) に開示する出版であり、そしてこの両出版はすべての目的のために本発明に採用するものである。

本発明はポリマーの合成とスクリーニングの技術分野に関する。さらに具体的に述べると、本発明は一つの真鍮板において、多数なポリマー配列のアレー (array) の改良合成法と改良合成装置を提供するものである。本発明の特別の態様によって、ペプチドまたはオリゴヌクレオチドのような多数なポリマー配列の合成方法が提供される。この多数なポリマー配列は、例えば結合アフィニティーを決定するためのスクリーニング試験に用いることができる。

ペプチド配列のような所望のポリマー配列の合成方法は当該技術分野では公知である。オリゴヌクレオチドの合成方法は例えば *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, Gate 編集、IBL Press社 Oxford 1984 年に見られる。なおこの文献はすべての目的のために全体を本発明に採用するものである。いわゆる "メリフィールド" の固相ペプチド合成法は何年もの間普通に利用されており、Harrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, 85 巻, 2149-2154 頁, 1963 年に報告されている。なおこの文献はすべての目的のために本発明に採用するものである。固相合成法はいくつかのペプチド配列を例えば多数の "ピン" 上に合成するのに提供されている (例えば Gayossra, *J. Immun. Meth.*, 1982 巻, 259-274 頁, 1982 年参照)。なおこの文献は

いる。さらに先に引用した Federらの PCT 特許開示には、VLSIP3 (登録商標) の方法を行うのにコンピュータ制御システムを使用する提供された方法が記載されている。この方法を用いると、ポリマーの一つの非相同アレーが、多数の反応部位における同時のカッピングによって、異なる非相同のアレーに変換される。この方法は一般に "組合わせの (combinatorial)" 合成法と呼ばれている。

VLSIP3 法はかなり成功した。しかし場合によっては、光を活性化因子として使用しないかまたは光だけを使用するのではない別の/追加のポリマー配列形成法が望まれている。

発明の要約

本発明は多数なペプチドおよび多数なオリゴヌクレオチドのような多数なポリマー配列の高密度アレーを合成する方法と装置を提供するものである。さらに、本発明は化合物の利用可能なライブラリーを基板の特定の位置に通り込む (および場合によっては固定化する) 方法と装置を提供するものである。好ましい実施態様では、各モノマーなどの反応物を単一の基板上の多数の反応部位に通り込み、そこでこれら反応物を平行して反応させる。

本発明の好ましい実施態様によれば、一連のチャンネル、溝またはスポットが基板上または基板に形成されて形成される。試薬は、チャンネル、溝またはスポットを通じて選択的に流されるかまたはこれらチャンネルなどの中に堆積され、異なる化合物を含有するアレーを形成し、そしていくつかの実施態様では基板上の選択された場所にいくつかのクラスの化合物を含有するアレーを形成する。

本発明の第一の特別の態様では、その表面に溝のような一連のチャンネルを有するブロックが利用される。そのブロックは透明体化されたガラスなどの基板と被覆させて配置される。第一ステップでは

すべての目的のために本発明に採用するものである)。他の固相法としては、例えばカラム内に支持された異なるセルロースディスク上に各モノマーのペプチド配列を合成する方法がある (Prest および Berling, *Tetrahedron*, 44 巻, 8931-8949 頁, 1988 年参照)。この文献はすべての目的のために本発明に採用する)。さらに他の固相法は Beall の米国特許第 4, 788, 502 号および国際特許公開第 WO90/00425 号 (Beall, 発明者) に記載されている。

上記の方法は、ポリマーの比較的密度のアレーしか産生しない。例えば Gayossra の上記文献に記載されている方法は、標準の微量測定用プレートの寸法で配列を置いたピン上に 96 個のポリマーを産生するのに限定されている。

ペプチド、オリゴヌクレオチドなどのポリマー配列の大きなアレーを短時間で製造する改良法が考慮されている。特に考慮すべきなのは Pirrung の米国特許第 5, 143, 884 号 (また PCT 特許公開第 WO90/18070 号参照) および Federら, PCT 特許公開第 WO92/10092 号であり (これらの文献はすべて本発明に採用する)、例えば先による合成法を用いてペプチドなどのポリマー配列の巨大なアレーを形成する方法が開示されている (Federら, *Science*, 251 巻, 787-777 頁, 1991 年参照)。この文献もすべての目的のために本発明に採用するものである)。

ポリマーアレーの合成を自動化するある種の研究が行われている。例えば Southern, PCT 特許公開第 WO90/18071 号には、通常のペンプロッタ (pen plotter) を使って 3 個のモノマーを、基板上の 12 の刻印の場所に堆積させることが記載されている。これらのモノマーは次に反応して、各々 12 個のモノマーの長さの 3 個のポリマーを生成した。また上記 Southern の出版には、基板上にモノマーを堆積させるのにインクジェットプリンタを使用する可能性も記載されて

ビベッタなどの通り込み装置を用いて、選択された試薬をチャンネルに供給された一連の開口の一つ以上に滴入させるかまたは試薬をチャンネル内に直接入れ、チャンネルを第一試薬で満たして基板をストライプ (stripe)、第一試薬のモノマーをそれにカッピングさせる。第一試薬のモノマーは同種である必要はない。例えばモノマー A は第一試薬のチャンネル内に入れてもよく、モノマー B は第二試薬のチャンネル内に入れてもよくおよびモノマー C は第三試薬のチャンネル内に入れてもよい。これらのチャンネルには、その後いくつかの実施態様では追加の試薬を加え、追加のモノマーを第一試薬のモノマーにカッピングさせる。次にブロックは平行移動させるかまたは回転させて再び基板上に置き、この工程を第二の試薬に繰返し、第二試薬のモノマーを基板の異なる領域にカッピングさせる。この工程を、所望の配列と長さのポリマーの多数な組合わせが基板の上に形成されるまで繰返す。この工程によって、ペプチドまたはオリゴヌクレオチドのような多数なモノマー配列を有する多数のポリマーが基板上の既知の場所に形成される。

本発明の第二の態様では、一連の微小チャンネルまたは微小溝が基板上、微小バルブの適切なアレーによって形成される。これらのチャンネルとバルブは透明体化された表面上に選択された試薬を流動させるのに使用される。微小バルブは、特定のカッピングステップに対してどのチャンネルを開くかを決定するのに使用する。

したがって、本発明は、一つの真鍮板として、単一の基板すなわち表面に複数の選択された領域を有する基板に多数なポリマー配列を形成する方法を提供するものである。この方法は次のようなステップで構成されている。すなわち、真鍮板面に形成して複数のチャンネルを形成し、そしてこれらのチャンネルは少なくとも部分的に、真鍮板の選択された領域の一部で形成された壁を有し; 次いでチャネ

ル中に選択された試薬を入れて、選択された領域の部分でポリマー配列を合成し、そしてその選択された領域の部分は、少なくとも一つの他の選択された領域内のポリマーとは異なるモノマーの配列を有するポリマーを合成しているステップで構成されている。別の実施形態では、チャネルまたは微細構造が選択された反応領域を形成している。例えばその基板は一面の開口する平坦なチャネルであり、各々がその中に反応部位をもっている。

本発明は、第三の態様として、不連続領域によって互いに分離された不連続反応領域のアレーを有する基板を提供するものである。一つの実施形態では、第一モノマーの溶液を、適切に調整された基板の第一組の反応領域上にスポット (spot) をさせる。次に、第二モノマーの溶液を第二組の領域上にスポットさせ、次いで第三モノマーの溶液を第三組の領域上にスポットさせ、これを順に行って多数の領域毎に一つのモノマーを配置する。これらのモノマーを基板表面と反応させ、次にその基板を洗浄して、新しいセットのモノマーとの反応に備える。反応領域とモノマー溶液の各々のグループ分けを行い上記のステップを繰返すことによって、最終的にモノマーの配列を制御された二量体、三量体および大ポリマーが製造される。別の実施形態では、アレーのポリマーなどの化合物が完全な膜として領域内に塗り込まれ、そのため上記のポリマー合成のステップは不要である。

好ましい実施形態では、基板の表面上の反応の反応領域は、閉鎖する反応領域間で反応物が拡散するのを防止する非反応領域のような閉じこめ領域で囲まれている。したがって一つの領域内の反応物は、他の領域に流入することはできず、その他の領域の反応を干渉することはない。ある好ましい実施形態では、アレーの領域は、光反応性の疎水性保護基を含有する基板表面に選択的に光を照射する

ことによって形成される。表面に光が照射された領域の疎水性保護基は除去され、反応領域が形成される。水溶液などの水性反応物の拡散を反応領域内に増進させると、その溶液は、基板表面に対して比較的大きな接触角を有するので、増進させる量を調節することによって、閉鎖領域へ流入しないよう保証することができる。

本発明の特性と利点は、本明細書の後述の部分と図面を参照することによって一層よく理解できるであろう。

図面の簡単な説明

図1は本発明を示す一般図である；

図2は各種ポリマーのアレーを合成する際に行われる処理ステップを示す流れ図である；

図3は得られたポリマーのアレーのマッピングである；

図4a~4cは20個のアミノ酸の基本組合せから9400万のヘキサペプチドを合成するのに用いる六つのプロセスステップにおける3チャネルのブロック図の配置を示す；

図5aはポリマー配列のアレーを合成するのに用いる装置の第一実施形態の平面図であり、図5bは同装置の断面図である；

図6はチャネルブロックに接続させて基板を支持するのに用いる圧力チャンバーを備えた実施形態の断面図である；

図7aと7bは二つの異なる「扇形アレー (fanned array)」のチャネルブロックの2種の平面図である；

図8は本発明の一つの実施形態によるチャネルブロックおよび付属開口の詳細断面図である；

図9はチャネルブロックの流動口の詳細断面図である；

図10はカップリング化合物と試薬をフローセルに送り込むのに用いる流動システムの概略図である；

図11aと11bは一つのチャネルブロックからもう一つのチャネルブロックに基板を移すのに用いる装置を示す。

図12は多チャネルの図面合成の概略図である；

図13aと13bはチャネルブロック内の異なる配置を示す；

図14は本発明のいくつかの疎水性基を製造するのに用いる反応機構を示す図式である；

図15aと15bは微小バルブ装置を示す；

図16aと16bは本発明の別の実施形態を示す；

図17は蛍光染料に選択的に結合された基板について予想される蛍光強度のマッピングである。

好ましい実施形態の説明

目次

- I. 用語の説明
- II. 一般事項
- III. 試薬の機械的送り込み法
- IV. 流動チャネルの実施形態
- V. スポットティングの実施形態
- VI. 別の実施形態
- VII. 実施例
 - A. 簡便試験
 - B. YGGFL の形成
 - C. 100 ミクロンのチャネルブロック
 - D. チャネルマトリックスのハイブリッド形成装置
- VIII. 結論

1. 用語の説明

下記の用語は、本明細書で用いられる場合以下の一般的な意味をもつ

ているものとする。

1. リガンド：リガンドは受容体によって認識される分子である。本発明によって試験することがあるリガンドの例としては、限定されないが、細胞膜受容体に対するアゴニストとアンタゴニスト、酵素と基質、ウイルスのエピトープ、ホルモン、オピオイド、ステロイド、ペプチド、酵素の基質、細胞因子、抗体、レクチン、糖、オリゴヌクレオチド、核酸、オリゴ糖およびタンパク質がある。

2. モノマー：モノマーは小分子のセットのメンバーであり、その小分子は共に連鎖しているかまたは連続可能で二つ以上のメンバーで構成されたポリマーまたは化合物を生成する。モノマーのセットとしては、限定されないが、例えば通常のL-アミノ酸のセット、D-アミノ酸のセット、合成および/または天然のアミノ酸のセット、ヌクレオチドのセットおよびペントースとヘキソースのセットがある。ポリマー内のモノマーの特定の定序 (ordering) は本明細書ではポリマーの「配列」と呼ぶ。本明細書で用いる場合、モノマーという用語はポリマーの合成に用いる基本セットのメンバーを意味する。例えば、20個の天然のL-アミノ酸の二量体はポリペプチドを合成するのに用いる 400個のモノマーの基本セットを形成する。異なる基本セットのモノマーが、ポリマー合成のその後に続くステップで使用される。さらにこれらのセットは各々、保護されたメンバーを含有し、このメンバーは合成後除去される。本発明は、本明細書では主として、アミノ酸のようなモノマーの配列を有する分子の製造について説明されるが、他のポリマーを製造する場合にも容易に適用することができる。このようなポリマーとしては例えば、核酸、多糖、リン脂質、ならびに α -アミノ酸、 β -アミノ酸もしくは ω -アミノ酸を含有するペプチドの直鎖および環状のポリマー；上記のものはいずれかに公知の原則が共有結合しているヘテロポリマー；

ポリメタクロアチド；ポリウレタン；ポリエスチレン；ポリカーボネート；ポリ酢酸；ポリアミド；ポリエチレンイミン；ポリアミン；スルフィド；ポリシロキサン；ポリイミド；ポリアセチンなどのポリマーがあるが、本願の開示を見れば明らかになるであろう。上記のポリマーは、異なるモノマー配列を有するポリマーが基盤の予め形成された異なる領域に形成されると、「多相」ポリマーになる。ポリマーの酸化性およびポリマーのポリマー配列は、「POLYMER REVERSAL ON SOLID SURFACES」という名称で1991年11月22日付けで出願された同時係属出願の米国特許第 798,737号に開示されている。なおこの文献はすべての目的のために本願に使用されるものである。

3. **ペプチド**：ペプチドは、モノマーが α -アミノ酸でありそしてアミド結合で連結されているポリマーであり、ポリペプチドとも呼ばれる。アミノ酸は α -アミノ酸または β -アミノ酸でもよい。ペプチドは1個以上のアミノ酸モノマーの長さであり、20番を超えるアミノ酸モノマーの長さの場合が多い。アミノ酸については標準の縮略記が使用される（例えばプロリンに対してはPを用いる）。これらの縮略記はBryer, Biochemistry, 第3版, 1973年に記載されている。なおこの文献はすべての目的のために本願に使用されるものである。

4. **受容体**：リガンドに対してアフィニティーにもっている分子である。受容体は天然物または人造の分子である。これらの分子は、その未変化した状態または他の種との複合体として利用することができる。受容体は、結合モノマーに、直接または特定の結合物質によって、共有結合または非共有結合によって結合することができる。本発明で利用される受容体の例としては、限定されないが、抗体、細胞膜受容体、特定の抗原決定基と反応性のモノクローナル抗体と

抗原、ウイルス、細胞、細胞、ポリメタクロアチド、核酸、ペプチド、糖質、レタチン、糖、多糖、糖脂質および糖蛋白質がある。受容体は、細胞膜分野ではリガンドと呼ばれることがある。受容体という用語は本願で用いる場合、意味の差は全くない。「リガンド・受容体の対(ligand receptor pair)」は二つの分子が分子の両端によって結合して複合体を形成する場合に形成される。

本発明によって試験することができる受容体の具体例としては以下のものがある。

a) **膜受容体**：膜受容体の存在に必要な特定の糖タンパク質もしくは脂質のような膜受容体に結合するリガンドを認識することは、新しいクラスの膜受容体を開発するのに有用な手段であろう。特に価値があるのは、現在使用中の膜受容体に対して阻害剤と競合する膜受容体、膜受容体および細胞に対する膜受容体である。

b) **酵素**：例えば受容体は酵素伝達物質の分解に関与する酵素のような酵素の結合部位をもっている場合がある。この種の受容体に対するリガンドが酵素伝達物質を分解する酵素の作用を阻害するのを認識することは酵素伝達物質の阻害の治療に使用できる薬剤を開発するのに有用である。

c) **抗体**：例えば本発明は、特定の抗原のエピトープと結合するリガンド結合部位を有する、抗体分子の受容体を試験するのに有用である。抗体エピトープに類似している配列が決定されると、免疫原が一つ以上のかような配列に基づいているワクチンが開発されるようになるか、または例えば自己免疫症に対する阻害剤または治療に有用な化合物（例えば「自己」抗体の結合を阻害することによる）が開発されるようになる。

d) **複製**：特定の配列を合成して、合成された配列に対して受容体として作用する DNA もしくは RNA の結合配列を創制することができ

る。

e) **細胞ポリペプチド**：一つ以上の反応物の一つ以上の産物への反応に関与する化学反応を促進できるポリマー好ましくは抗体である。このようなポリペプチドは一般に、少なくとも1個の反応物もしくは反応中間体に対して特異的な結合部位およびその結合部位の近くに触媒活性性を有し、触媒された反応物はこの活性性によって触媒することができる。細胞ポリペプチドなどは例えば、PCT特許公開第W090/05748号、同第W090/05749号および同第W090/05755号に記載されており、これらの文献はすべての目的のために本願に使用されるものである。

f) **ホルモン受容体**：インシュリンや成長ホルモンに対する受容体のような受容体に対して高いアフィニティーで結合するリガンドを認識することは、例えば糖尿病治療が糖尿病の症状を軽減するために必要となければならない毎日の注射剤の回数を減らすための成長ホルモンの代替品を開発するのに有用である。ホルモン受容体の他の例としては血管収縮ホルモン受容体がある。そしてこれらの受容体に対するリガンドを認識すると、血管を収縮する薬剤が開発されるようになる。

g) **オピオイド受容体**：脳内でオピオイド受容体に結合するリガンドを認識することは、モルヒネおよび類似薬剤の低中毒性代替品を開発するのに有用である。

5. **基盤**：固体または半固体の表面を有する材料である。多くの実施形態において、基盤の少なくとも一つの表面は実質的に平坦であるが、いくつかの実施形態では、基盤は、例えばウェル、突き出た領域、エッチングを行ったトレントなどで、異なるポリマーの合成領域を物理的に分離することが望ましい。いくつかの実施形態では、基盤自体がウェル、トレント、流動領域などを備えており、これら

が合成領域の全体または一部を形成している。他の実施形態では、小ビーズが基盤の表面上に提供され、ビーズ上に合成された化合物は合成が完了した後に放出させる。

6. **チャネルブロック**：その表面に複数の溝またはくぼんだ領域を有する材料である。その溝またはくぼんだ領域は各種の幾何学的形態をもっているが、限定されないが線形、環形、蛇行形、放射状形などがある。チャネルブロックは種々の方法で製造することができ、シリコンブロックのエッチング、ポリマーの成形もしくは圧縮などの方法がある。

7. **保護層**：モノマー単位に結合され、次にモノマー単位から選択的に除去され、例えば抗体例のアミノ酸の場合のアミン基のような反応部位を露出する物質である。保護層の具体例は、Federら、PCT特許公開第W092/10002号（すでに本願に使用されている）および1993年11月2日付けで出願された米国特許第 798,737号（代理人参照番号 11509-68、すべての目的のために本願に使用されるものである）で開示されている。

8. **予め形成された領域 (predefined region)**：予め形成された領域は基盤上の局所的な領域であり、選択されたポリマーを形成するのに用いられるか、用いられたかまたは用いるのを目的とする領域である。そしてあるいは本願では「反応」領域、「選択された」領域または単に「領域」と呼ばれる。この予め形成された領域は幾何学的な形状を有し、例えば円形、長方形、楕円形、くさび形などがある。いくつかの実施形態ではそれ以上に各領域のポリマー配列が合成される領域は約1 μ mより小さく、好ましくは1 μ mより小さく、さらに好ましくは0.5 μ mより小さい。最も好ましい実施形態では、これらの領域は面積が約10,000 μ m²より小さくまたはより好ましくは100 μ m²より小さい。これらの領域の中で、本発明で合成されるポ

リマーは実質的に純品の形態で合成することが好ましい。

9. 実質的に純品：ポリマーは、他の予め形成された領域から区別する特性を示す場合、基質の予め形成された領域内で“実質的に純品”であると考えられる。一般に純度は、均一な配列の純度として、生物学的な活性もしくは機能によって測定される。かような特性は一般に選択されたリガンドまたは受容体と結合させる方法で測定される。その領域は、予め形成された領域内で優勢な配列が望ましい配列であるように完全に純品であることが好ましい。本発明の好ましい態様によれば、ポリマーは純度が少なくとも95%、好ましくは10%を超えて90%まで、さらに好ましくは80%を超えて90%まで、最も好ましくは95%を超える。そしてこの目的のための純度は、予め形成された領域内で形成された所望の配列を有するリガンド分子の数、予め形成された領域内で形成された分子の合計数に対する比率を意味する。

II. 一般事項

本発明は多量の用途に使用することができる。例えば、本発明は、合成の手段（例えばペプチド合成の手段）として、スクリーニング手段（例えば薬剤の選別について化合物のライブラリーをスクリーニングする場合の手段）として、または診断/治療の手段（例えば薬学もしくは薬理の試験の手段）として使用することができる。一つの特定の実施形態で、本発明は核酸ベースの診断に用いられる。

合成の手段として本発明は、多数の異なるポリマー配列のアレーを形成する。好ましい実施形態では、本発明は、基質の選択された領域内に異なるペプチドまたはオリゴヌクレオチドのアレーを合成する。多数の配列をその上に形成されたかような基質は、例えば、その多数の配列および抗体と核酸のような受容体の相互作用を評価するためのスクリーニング試験で使用することができる。例えば、

好ましい実施形態で、本発明は、ペプチドをスクリーニングして、もしあれば、ペプチドの多数のセットのどれが受容体に対して高い結合アフィニティーをもっているかを検証し、および最も好ましい実施形態では、問題の受容体に対する各種のペプチドの相対的な結合アフィニティーを検証する。

上記の多数のポリマー配列は単一の基板上で合成することが好ましい。多数のポリマー配列を単一基板上に合成することによって、相対結合アフィニティーのような特性を評価するための配列の処理が一層容易に行われる。例えばペプチド配列のアレー（または他の化合物のライブラリー）を評価して、受容体に対するペプチドの相対結合アフィニティーを検証する場合は、基質全体と、したがってポリマー配列の全層もしくは一層は適切に標識をつけた受容体に対して暴露され同時に評価される。

いくつかの実施形態で、本発明は、合成化学化合物または天然産物の抽出物の莫大な収量を局在化させ、場合によっては固定化するのに利用できる。かような方法では化合物は基質の予め形成された領域に局在される。上記の固定化された単一の化合物（または複数の化合物）と、化学ライブラリーまたは生物学的抽出物のメンバーのような各種の試験組成物との反応を、上記ライブラリーもしくは抽出物の各メンバーの小部分を、異なる領域に対して用いて試験する。所望の特性を測定するのに、無条件定数などの公知の方法を使用することができる。例えばヒト受容体の大きな収量を、各領域内に一つづつ基板上に局在させてアレーを形成させる。次いで植物/動物の抽出物は、アレーの各領域受容体に対する結合性についてスクリーニングされる。

本発明は、先に本願に引用した米国特許第 5,143,854号に記載されている“光脱着式(light desorbed)”方法と共通の特徴をもって

いる。上記米国特許第 5,143,854号で考案されているこの光脱着式方法は、基質の予め形成された領域を活性化し次にその基質を予め選択されたモノマー溶液と接触させることからなる方法である。予め形成された領域は、マスクを通して示される光線によって活性化することができる（核酸配列の製造に用いられる写真平版法の方法による）。基質の他の領域は、マスクによって光の照射が遮断されるので不活性のままである。したがって、光のパターンによって、基質のどの領域が与えられたモノマーと反応するか選択される。異なるセットの予め形成された領域を順次活性化し、異なるモノマー溶液を基質に接触させると、ポリマーの多数のアレーが基板上に形成される。勿論、未反応のモノマーの溶液を基質から洗淨するような他のステップが必要な場合使用してもよい。

本発明では、機械的装置または物理的構造によって、与えられたモノマーと反応させるのに利用できる領域が形成される。いくつかの実施形態では、与えられたモノマー溶液が、基質の選択された少数の領域以外のいずれの領域にも接触しないよう遮断するため壁などのバリアーが用いられる。他の実施形態では、増幅されたモノマー（または他のものの）の量と基質の組成が、基板上の異なるモノマー溶液を分離する作用を行う。このことによって、異なるモノマーを同時に（またはほぼ同時に）異なる領域に送り込んでカップリングさせることができ、かつポリマーのアレーを形成するのに必要な副産物の洗淨などの反応ステップの数を減少させることができる。さらに異なる活性化領域における反応条件は独立して制御することができる。したがって、反応物の濃度などのパラメータは、反応部位から反応部位へと独立して変えてその方法を最適化することができる。

本発明の別の好ましい実施形態では、先または後のアクチベータ

を、物理的構造とともに用いて反応領域を形成させる。例えば光源が、同時に基質の多数の領域を活性化し、次に機械的システムが平行して異なる領域にモノマー溶液を導入する。

III. 試薬を機械的に送り込む方法

本発明の好ましい実施形態では、試薬は（1）予め形成された領域に形成されたチャネル内に投入させるかまたは（2）予め形成された領域に“スポッティング(spottling)”を行う”ことによって基質に送り込まれる。しかし、他の方法を、スポッティングと投入を組合わせて利用してもよい。各々の場合、基質の所定の活性化領域は、モノマー溶液が各々の反応部位に送り込まれる場合、他の領域から機械的に分離されている。

本発明の代表的な“フローチャネル(flow channel)”法は一般に次のように記述することができる。多数のポリマー配列は、基質の表面にフローチャネルを形成し、該チャネルを通じて適切な試薬を流動させるかまたは該チャネル内に適切な試薬を入れることによって、基質の選択された領域で合成される。例えばモノマー“A”を第一グループの選択された領域で基質に結合させねばならないと仮定する。選択された領域のすべてまたは一部の中の基質の表面のすべてまたは一部は、例えば適切な試薬をチャネルのすべてまたはいくつかを通じて流動させるかまたは基質全体を適切な試薬で洗淨することによって、結合を行うために活性化させる。基質の表面にチャネルブロックを置いた後、モノマーAを含有する試薬を、すべてのもしくはいくつかのチャネルを通じて流動させるか、またはすべてのもしくはいくつかのチャネル内に入れる。これらのチャネルによって第一選択領域は液体接触を行い、その結果モノマーAが、第一選択領域において、基質に直接もしくは間接的に（リンカーを通じて）結合される。

次にモノマー-Bを第二の選択領域にカップリングさせる。そしてこの領域のいくつかは第一選択領域中に含まれている場合がある。第二選択領域は、基板上のチャンネルブロックの平行移動、回転もしくは変換；選択されたパルプの開閉；またはホトレジスト層の沈着によって、第二のフローチャンネルで液体接触をしている。必要な場合、少なくとも第二領域を活性化するためのステップを実施する。その後、モノマー-Bを第二フローチャンネルを通じて流動させるかまたは第二フローチャンネル中に入れ、モノマー-Bを第二の選択された場所と結合させる。この特定の實施例では、基盤のこの段階で基盤に結合して生成した配列は例えばA、BおよびCである。この工程を繰返して、基板上の既知の場所に所望の長さの配列の長大なアレーを形成する。

基盤を活性化した後、モノマー-Aはいくつかのチャンネルを通じて流入させることができ、モノマー-Bは他のチャンネルを通じて流入させることができ、モノマー-Cはさらに他のチャンネルを通じて流入させることができる。この方法では、チャンネルブロックを移動させねばならなくなるかまたは基盤を洗浄および/または再活性化しなければならなくなるまで、多くのまたはすべての反応領域をモノマーと反応させる。利用可能な反応領域の多くまたはすべてを同時に使用することによって、洗浄と活性化のステップの回数を最少にすることができる。

本発明は図々の實施形態で、チャンネルを形成する別の方法または基盤表面の一部を保護する別の方法を提供するものである。例えば、いくつかの實施形態では、親水性もしくは疎水性のコーティング（樹脂の性質による）のような保護コーティングを、時には、他の領域の反応物接触による損れを容易にする物質を混合して、基盤の保護すべき部分を覆って利用する。この方式では、流入領域はさら

に、その指定領域以外を流れるのを防止される。

本発明の“スポットティング”の實施形態はフローチャンネルの両端部とほぼ同じ方法で実施することができる。例えばモノマー-Aは、予め適正に活性化された第一グループの反応領域に流り込んでカップリングさせることができる。その後モノマー-Bを第二グループの活性化反応領域に流り込んで反応させることができる。上記のフローチャンネルの實施形態と異なり、反応物は、比較的少量の反応物を選択された領域に（流入されるのではなく）直接噴霧させることによって流り込まれる。いくつかのステップでは、例如、基盤表面の全体に溶液をスプレーするか別の方法でコートすることができる。好ましい實施形態では、ディスペンサーが領域から領域へと移動し、停止することにモノマーを必要量だけ噴霧させる。代換的なディスペンサーは、モノマー溶液を基盤に流り込むマイクロピペットおよびマイクロピペットの位置を基盤に対して制御するロボット装置を備えている。他の實施形態では、ディスペンサーは、一連の配置、マニホールド、一連のピペットなどを備え、その結果、各領域の試薬を反応領域に同時に流り込むことができる。

IV. フローチャンネルの實施形態

図1は本発明の一實施例を示す。この特定の實施例では、モノマーグループA、B、CおよびDのモノマーと二量体が基盤の選択された領域で提供される。この基盤としては、生物学的、非生物学的、有機、無機またはこれらのいずれかの組み合わせの基盤であり、粒子、ストランド、沈着、ゲル、シート、管状物、球状物、容器、毛管管、パッド、スライス、フィルム、プレート、スライドなどとして存在している。基盤は便利ないずれの形態でもよく、例えば、ディスク形、四角形、球形、円形などがある。基盤は平坦な形態が好ましいが表面が各領域の別の表面形態であってもよい。例えば基盤は合成が

能なる導出した領域またはへこんだ領域をもっているもよい。

基盤とその表面は、本発明に記述の反応を実施するための支持体を形成している。これらのモノマーは、第一方向に基盤上にもしくは基盤に隣接して形成もしくは配置されている第一フローチャンネル流路 x_1, x_2, x_3 、および x_4 、ならびに第二方向に基盤上にもしくは基盤に隣接して形成もしくは配置されている第二フローチャンネル流路 y_1, y_2, y_3 、および y_4 を用いて提供される。第二フローチャンネル流路は第一フローチャンネル流路の少なくとも一部と交差する。これらのフローチャンネルは、本発明の他の部分で詳細に述べられている方法によって製造される。

最初、基盤には、例えば洗浄およびその後に“リンカー”分子を任意に配置するなどのような一種以上の予備処理を行う。また基盤は、各領域の活性基、ポリマーの一端を形成する共通のモノマー配列などを備えているもよい。

その後、第一カップリングステップで、一つ以上のフローチャンネルに第一モノマー-Aが供給され、そのモノマーは、フローチャンネルが基盤と接触している場所で、共有結合または他の方法で基盤に（直接もしくは間接に）結合する。図1に示す特定の實施例では、フローチャンネル x_1 と x_2 を用いて、これらのチャンネルに隣接する基盤の全長にわたって、基盤にモノマー-Aを結合させる。各カップリングステップは、いくつかの實施形態では、個々のサブステップで構成されている。例えば各カップリングステップには、洗浄、化学的活性化などを行う一つ以上のサブステップが含まれている。

その後または同時に、図2に示すように、第二モノマー-Bが選択されたフローチャンネルに供給され、モノマー-Bは、第二フローチャンネルが接触している場所で基盤に結合する。図2に示す特定の實施例ではモノマー-Bはチャンネル x_3 と x_4 にわたって提供される。モノ

マー-AとBがそれらのそれぞれのフローチャンネルを同時に流れると、二つのカップリングステップを同時に行うのに第一のプロセスステップ（process step）しか必要でない。“プロセスステップ”という用語は本図で用いる場合、一つ以上のチャンネルに一つ以上の試薬を注入することを意味する。“カップリングステップ（coupling step）”という用語はモノマーのポリマーへの付加を意味する。

その後プロセスステップは、図2の流れる図に示す方式でモノマー-CとDについて同様に結合、モノマー-Cはフローチャンネル y_1 と y_2 内で提供され、Dはフローチャンネル y_3 と y_4 内で提供される。モノマー-CとDはフローチャンネル y_1, y_2, y_3 を通じて同時に導入され、その結果二つのカップリングステップを第一のプロセスステップで実施することが好ましい。図1の白い領域は生成した試薬の交差部分を示す。

図3は上記のステップを用いて形成された配列のマッピングを示す。図3に示すように、配列A、B、C、D、AD、BD、ACおよびBCがわずかに2図のプロセスステップを用いて形成された。したがって、このプロセスは比較的少ないプロセスステップしか使用せずに、ポリマー配列の長大なアレーの合成を行うことができる。別の實施例によれば、4個のモノマーの基本セットの合計4⁴=16個の三量体を形成させるのに二つのプロセスステップしか使用する必要がない。別の實施例によれば、4個のモノマーの基本セットの合計4⁴個の八量体を形成させるのに、“x”方向に配向させた156個のフローチャンネルと、“y”方向に配向させた156個のフローチャンネルを設けて合計312個のカップリングステップしか必要としない。

この方法の威力はさらに、16個のアミノ酸の基本セットから8個の六量体ペプチドの完全なアレーを合成することによって表される。このアレーは、84,000,000の異なるペプチドを形成する20⁶すなわ

を84,000,000個の領域を有し、わずかに8個のプロセスステップで作ることができる。さらにこの方法は異なる型版をわずかに1回しか必要としない。第一の型版は20本の平行なチャネルを有し、第二の型版は縦が各々第一型版のチャネルの1/20の400本のチャネルを有し、そして第三の型版は縦が各々第二型版のチャネルの1/20の8000本のチャネルをもっている。各型版は、二回のプロセスステップで、図4に示すように、各々他方に対して90°の方向で使用する。第一の型版によって、基板は活性化され次いで20個のアミノ酸の基本セット（または他の20個のメンバーの基本セット）の各々の層を流入させ、第一方向の、異なる予め形成されたストライプ上で反応させる。これは第一のプロセスステップであり、20のカップリングすなわち結合のステップを含み、同時に実施することができる。次に基板全体を再び活性化し、第一型版を、第一方向に対して直交の第二方向に配置する（図4a）。次いで20個のアミノ酸の層を20個の新しい予め形成されたストライプにそって流入させる（このストライプは各々元のセットのストライプに対して直交である）。これらの二つのプロセスステップにおいて、20個の予め形成された領域（フローチャネルにそったストライプ）はまず活性化され、次いで個々のモノマーを接触させると、合計20個のストライプは、次の活性化ステップが必要になるまで反応する。換言すれば、20のカップリングステップが平行に実施され、活性化ステップの必要回数が大きく減少する。

残りの四つのカップリングステップは第二と第三の型版を使用する。第三と第四のプロセスステップ（図4b）では20本のチャネルが各々モノマーに充填され、第五と第六のプロセスステップ（図4c）では400本のチャネルが各々モノマーに充填される。最初の二つのステップの場合と同様に、基板全体が第一のプロセスステップ中に反

応を受ける。したがって、84,000,000個のペプチド六量体の金ライブラリーを製造するのにわずかに8個のプロセスステップ（合計約24時間を要する）しか必要でない。異なる実施態様では、通り込みを制御する9000本のチャネルを有する第一の型版（例えば第1ラウンドでの20個の各アミノ酸に対する400チャネル）がわずかに一回の型版ステップで六量体の金ライブラリーを製造することができる。したがって本発明は多様なポリマーアレーを極めて迅速に製造する方法を提供するものである。

図5aと5bは上記の合成ステップを実施するのに使用される装置の第一実施態様の詳細を示す。詳しく述べると図5aは装置を平面図で示し、一方図5bは装置を断面図で示す。図5に示す特定の装置態様では、装置は基板401上でポリマー配列を合成するのに使用される。基板401は図5aに示す403に取付けられ、かつクランプ405によってチャネルブロック407に対して保持されている。チャネルブロック407には、その中に、複数のチャネル409がストライプの形態でエッチングされている。各チャネルは流入口411と流出口413を備えている。減圧源415が一つ以上の流出口413に適用され、一方、ビベッタ417が移動可能にアーム419に取付けられ、貯槽421から選択された流入口411に選択された試薬を通り込む。

第二の好ましい実施態様の詳細は図6~11に示す。図6は、圧力チャンバー101内で、基板111に対して均一に分布する圧力によって、基板111を、チャネルブロック109に当接させて適正な位置に保持する装置を示す。加圧ガスをガス圧入口103から入れて、クランプ圧を与えて、基板を固定し、一方流体は流体流入口115からチャネル123を通じて流入させ次いで流体出口117から流出させる。圧力チャンバーハウリングの上方部分105と下方部分125はナット121とボルト104によってともに保持されている。圧力チャン

バーハウリングの部分をとともに保持するのに、クランプのような他の手段も勿論使用できる。

図7は本発明のチャネルブロックの好ましい流路の構成を示す。図7aに示すように、流体通り込み部位127, 129, 131, 133, 135および127は反応領域141に至るチャネルに接続されている。類似の配置を図7bに比較するために示すが、図7bでは、反応領域におけるフローチャネルの方向が長方形のチャネルブロック上で90°シフトしている。外部減圧ラインへの減圧口145と146が設けられその結果、基板の位置は流体が流動中、維持される。

図7aと7bに示すチャネルは、製造回路に用いられるリード線のパターンに類似の方式で、チャネルブロック109上に「矩形チャネルアレー」を形成している。このことによって、反応領域におけるチャネルの密度が高いのに比べて、流体通り込み点間の距離が著しく増大している。1インチ×3インチの基板において、一般に空欄の距離が、矩形の配置によって、少なくとも約4:1の比率で増大している。したがって反応領域におけるチャネルが200ミクロン離れている場合、通り込み口は0.8mm離れさせることができる。

その間隔距離は、通り込み口127, 129および131について示すように通り込み口をずらすことによってさらに増大させることができる。このようにすることによって、少なくとも約3:1の比率でチャネルの距離をさらに増大させることができる。したがって、200ミクロンの距離で反応領域のチャネルが離れている場合、矩形アレーをずらすことによって、通り込み口間の距離は2.4mmになる。したがって流体は、反応領域のチャネルの高密度アレーに、毎秒の1.6mmのテフロン（登録商標）のチュービングから通り込むことができる。追加の間隔が必要な場合には、基板の大きさを大きくし一方反応領域の大きさは維持する。

図8に示すように、流体通り込み口は、チャネルブロック上の位置決めプレート（stabilizing plate）108の上面の通孔から形成されている。この位置決めプレートは、薄板パイレックスで製造することが好ましいが、圧力チャンバー内でクランプしている間、チャネルブロックに対して滑動の一体性を与える。またこの位置決めプレートはチャネルブロックの流入口を形成し、通り込み口またはチャネル間の漏洩を減らす手段も提供する。好ましい実施態様では、チャネルブロックのチャネル123は一般に被覆膜または封鎖された材料であるウェーハ106で形成され、好ましくはエッチングされたシリコンまたは被覆に切削されたセラミックである。他の実施態様では、チャネルブロックは適切なポリマー材料から圧力成形または射出成形によって製造される。チャネルブロック装置全体は剛性のチャネルブロックのサブプレート110上に取付けられ、このサブプレートには真空ライン112、流体通り込みライン115の流入口、流体流出ライン117の出口、およびプラグ先端151と153のくぼんだ部分が設けられている。この装置によって、基板はチャネルブロックの上面に対してクランプすることができ（図9の実施態様に示すように減圧または加圧のガスによる）、一方流体は下から入り下から流出する。サブプレートは、ステンレス鋼またはアノード酸化アルミニウム（アルマイト）のような硬質材料で製造することが好ましい。

個々の製造装置の接続部は各チャネルについて、図8に示すように製造することができる。プラグ先端151には、円筒形の上面が設けられ、その上面はパイレックス製の位置決めプレート108の円筒形凹部118と嵌合している。またプラグ先端151は円筒形の下面を有し、この下面はサブプレート110の円筒形凹部118と嵌合している。このサブプレートと位置決めプレートは、ボルト114とねじ付

を挿入部分 115、または他の適切な係合手段によってともに保持されている。

図18は本発明の好ましい装置の縦断面図を示す。圧力はポイント25 (P1) とポイント21 (P2) において制御されて、圧力降下 (P1-P2) が装置の両端間で維持される。活性化されたモノマーのようなカップリングする化合物は貯蔵21、22および23から供給される。追加の試薬源は貯蔵15、17および19から供給される。勿論、図18に示すモノマーとカップリング試薬の貯蔵は、可能性のある一層大きなシリーズの貯蔵の代表例である。該装置とカップリング化合物はノード (node) 27、28および29で開合され次いでチャネルブロック 123に導入される。適切な装置とカップリング化合物の開合はノードのバルブによって制御され、またこれらのバルブは電子制御器23によって順に制御される。装置の両端にわたって調整された吐出量はライン35によって放出される。

図19に示す装置は、ごく少数の反応を調整することによって全チャネルを平行に制御することができる。例えば、P1とP2を固定することによって、全チャネルの両端間の圧力勾配が同時に一定に維持される。したがって、全チャネルの流量は、フローチャネルの断面積と流体のレオロジー特性によって定まる。チャネルは断面積が均一でありかつカップリング化合物は一般に単一断面による均等分配として供給されるので、均一な流量が全チャネルにわたって得られる。この装置の場合、全チャネルでのカップリング時間は、この装置の両端間の圧力勾配を単に調整することによって同時に変えることができる。この装置のバルブは、制御器23からの単一の電子出力によって制御することが好ましい。

図7に示す矩形チャネルアレー構造は、化学合成中に続けて実施するプロセスステップに用いる二つの別個のチャネルブロックを示

す。一方のブロックは固体基板上の水平アレーを形成し、他方のブロックは垂直アレーを形成する。化学化合物の交差する縦列と横列のマトリックスを制作するために、固体基板は連続するプロセスステップ中に、一つのブロックから他方のブロックへと移動させる。多くの実施例は、一通りのプロセスステップ中、一つのブロックから他のブロックへの一面の移動しか必要でないが、図11aと11bに示す矩形チャネルアレーのトランスファブロック78は、移動を促進する間、固体基板71のチャネルブロック79に対する正確な位置合わせを維持する装置を提供する。いくつかの実施形態では、単一のチャネルブロックを、必要となるときに90° 回転するだけで、水平と垂直方向のアレー用に用いることができる。

このトランスファブロック (transfer block) は、固体基板の寸法特性が心合せに用いられないように、チャネルブロックに対して位置決めが行われる。トランスファブロック78はチャネルブロックに対して運動学的マウント41 (kinematic mount) によって心合せがなされ、一方鎖区は、チャネルブロックの鎖圧ライン63からトランスファブロック上の鎖圧ライン77に切換えられる (通常作動中)。鎖圧によって基板はチャネルブロックに対して位置保持される。この基板とトランスファブロックは次いで移動させて、第二のチャネルブロックに対して再び位置合わせを行う。鎖圧を第二チャネルブロックに切換えて、基板を正確なアラインメントに保持する。このようにして、個々の基板の寸法が異なっても、プロセスステップ間の正確な位置合わせが保証される。またトランスファブロック装置は、鎖線および光によるプロセスステップの両方を利用する実施例で、フローセルに対する出し入れの移動中マトリックス領域のアラインメントを保持する。

いくつかの実施形態ではチャネルブロックは利用する必要がない。

あるいは、いくつかの実施形態では、小“ストリップ (strip)”の装置を、例えばビベックでその基板またはチャネルにストライプをつけることによって造る。この実施形態は本発明のスポットティングによる実施形態にいくらか類似している。別の形態によればチャネルは、半導体装置に広く用いられているようなホトレジストを堆積させることによって形成される。このような材料としては、ポリメチルメタクリレート (PMMA) とその誘導体およびポリオレフィンスルホン樹脂のような電子ビームレジストなどがある (Ghaadi, "VLSI Fabrication Principles," Wiley社 (1983年)、10章に一部詳しく記載されている。なおこの文献を、すべての目的のため全体を本願に引用するものである)。これらの実施形態では、レジストを堆積させ、選択的に露光し、エッチングを行い、基板の露光された部分をマスクしてカップリングを行う。レジストを堆積させ、選択してレジストを除去、次いでモノマーをカップリングさせるこれらのステップを繰返して、所望の配列のポリマーを所望の場所に形成させる。

いくつかの実施形態では、基板の所定の領域を活性化するのにレジストを利用できる。例えば、酸化ポリマーのようなある種のレジスト材料は光を照射されるとプロトンを放出する。これらの実施形態によれば、このような材料で被覆された基板は、マスクを通じて照射されるかまたは他の方法で選択的に照射されると、基板の照射された領域は酸性状態に暴露される。基板上の酸で変化する保護層または基板上のオリゴマーが除去され、活性化された領域が露出する。この時点でそのレジストのすべてまたは一部を除去することができる。好ましい実施形態では、レジストは活性化された領域のみが除去され、その結果、チャネルが活性化された領域で形成される。あるいはレジストは基板全体から除去されることがある。この場合、

別のチャネルブロックを基板に堆積させてフローチャネルを形成させるか、または通常のVLSIプロセスを使用してもよい。

好ましい実施形態において、基板は通常のガラス、バイレックス、石英、各種のポリマー物質のいずれか一つなどがある。勿論、基板はシリコン、ポリスチレン、ポリカーボネートなどのような各種の物質のいずれか一つで製造することができる。

好ましい実施形態では、チャネルブロックは、シリコン、または3M社が製造し商品名Kel-F (登録商標) 89で知られている物質のようなポリクロトリフルオロエチレンで製造されているが、ポリスチレン、ポリカーボネート、ガラス、DuPont社が製造しているKallresのようなエラストマー、各種のセラミック、ステンレス鋼などのような広範囲の物質も利用できる。

チャネルブロックのチャネルは、開通の材料によって、機械加工、圧縮成形、射出成形、平面印刷、レーザー切削などによって製造するのが好ましい。より大きなチャネルブロックを利用するいくつかの実施形態では、チャネルブロックのチャネルの突出した部分はラッピングフィルム (0.3mmグリット) を重ねることによって処理される。このような滑らかな表面によって、シーラントを使用せずに基板に対して優れた封止が行われ、それ故チャネルブロックを閉鎖する場合、基板上にシーラント物質が露出することはない。操作はすべて真空、常圧で行うことが好ましい。

特に好ましいチャネルブロックは磨きシリコンウェーハを化学的エッチング法で処理することによって製造される。化学的エッチング法は微細回路を製造するのに広く使用されている方法である。この方法によれば磨きシリコンウェーハの12.5mmの面積上に80本以上の100ミクロンのチャネルを容易に形成することができる。エッチングを行った後でも、ウェーハの上面 (ホウエッチング) 領域は、未

エッチングウェーハの極めて平坦な形態を保持している。したがってフローセル操作中、基板との密着が確実に行われる。

操作中、基板の表面は、例えば有機溶媒の酸化メチレン、 H_2F またはエチルアルコールなどで洗浄することによって適切に処理される。基板は、任意にその表面に適切なリンカー分子を付与してもよい。そのリンカー分子は、例えばアリアルアセチレン、 $3 \sim 10$ 個もしくはそれ以上のモノマーを含有するエチレングリコールのオリゴマー、ジアミン類、二酸類、アミノ酸類またはその混合物でもよい。その後、その表面には、TBOCもしくはPMOCで保護されたアミノ酸のような保護された基が付与される。このような方法は当該技術分野の当業者にとって公知である。

次いでチャネルブロックと基板は接触させて、チャネルブロックの開口および基板で囲まれた腔室チャネルを形成させる。チャネルブロックと基板が接触しているとき、保護基触媒剤と、最初に選択された一本のチャネルもしくはチャネル群の流入口にビベッタを置きおよび任意に配座部をチャネルの出口に配置することによって、選択されたチャネルを通じて導入する。例えばTBOCで保護されたアミノ酸の場合、この保護基触媒剤としては例えばトリフルオロ酢酸(TFA)がある。なおこのステップに続いて任意に、例えばジクロロメタン(DCM)で洗浄して過剰のTFAを除去するステップを実施してもよい。

次に、最初のアミノ酸もしくは他のモノマーAを最初に選択したフローチャネルを通じて導入する。この最初アミノ酸もTBOC、PMOC、またはHYOCなどのような適切な保護基を付与されている方が好ましい。またこのステップの場合も続いて適切な洗浄ステップが実施される。第一群のチャネルで利用される洗剤/カップリングのステップは、追加の群のチャネルで同時に行われるかまたはその後に行

進して行われる。好ましい実施態様では、モノマーAが第一群のチャネルを通じて導入され、モノマーBが第二群のフローチャネルを通じて導入されるなどして、その結果各種の異なるモノマーが基板の平行のチャネルにカップリングされる。

次いで、基板とチャネルブロックを分離し、次いで任意に、基板全体を適切な物質で洗浄して、チャネルが基板と接触する部分から不要な物質を除去する。

基板および/またはブロックは次に、任意に洗浄し、次いでステップとともに平行移動および/または回転させる。好ましい実施態様では、基板はその元の位置から 90° 回転させるが、いくつかの実施態様では例えば $0^\circ \sim 180^\circ$ の範囲のより小さいかもしくは大きい回転を行わせる。図1に示す装置について考慮したような他の実施態様では、二つ以上の異なるチャネルブロックを用いて、基板を動かして異なるフローパターンが作製される。チャネルブロックは、回転させるとき、同時に基板に対して平行移動させることができる。“平行移動させる”という用語は、基板および/またはチャネルブロックの相対的な運動を意味し、一方“回転”という用語は、基板および/またはチャネルブロックが、それらに垂直な軸線のまわりを回転することを意味する。いくつかの実施態様では、その相対的運動は、合成の異なる段階に対して異なる角度で行われる。

保護基およびアミノ酸などのモノマーのカップリングのステップを繰り返して、基板の表面にポリマーのアレーが形成されるに至る。例えば、モノマーBを選択されたフローチャネルを通じて導入して、最初の位置のチャネルブロックによって形成されたチャネルと、そのチャネルブロックを 90° 回転させて形成されたチャネルとの交差部分にポリマーAから得られる。

チャネルブロックの回転は本発明の好ましい実施態様によって行

われるがこのような回転は必要でない。例えば、単に異なる試薬をチャネルを通じて導入させることによって、異なるモノマー配列を有するポリマーを形成させることができる。単に一つの具体例では、第一カップリングステップで最初のチャネルの一部にモノマー“A”が充填され、一部にモノマー“B”が充填される。次いで上記の第一チャネルの全部もしくは一部にモノマー“C”を充填し、および第二チャネルの全部もしくは一部にモノマー“D”を充填して、配列ABとCDが形成される。このようなステップを用いて、10個のモノマーの基本セットと100個の群を有するチャネルブロックを使用して100個の配列を形成させることができるであろう。

他の実施態様で、本発明は図12に示すマルチチャネル図相合成器を提供するものである。この実施態様では、チューブのマニホールドまたは収容体1000のような通り込みラインの収容体が活性化された試薬を合成支持体マトリックス1002に送り込む。チューブ収容体1000は装置の合成ブロックマニホールドの形態を有し、このマニホールドは合成支持体マトリックス1002と正確に心合わせを行うことができる。この支持体マトリックスは、化合物を固定化または合成することができる複数の反応領域を備えている。好ましい実施態様では、これらの反応領域は、合成フリット、パッドまたは制御などを含有している。

支持体マトリックスの個々の反応領域に送り込まれた液体は、反応領域を通過して、廃棄物処理領域、再循環タンク、分離器などに導入する。いくつかの実施態様では、反応液体は、単に重力の作用で反応領域を通過し、一方他の実施態様では、反応液体は、減圧もしくは圧力によって反応領域を通じて引出されるか押出される。

支持体マトリックスの個々の反応領域1004は壁またはガスケット1001によって互いに分離されている。これらの壁またはガスケット

は、一つの反応領域中の反応物液体が隣接している反応領域中に移動して汚染するのを防止する。一つの実施態様では、その反応領域は、制御または反応混合物が充填されているチューブが形成されている。このガスケットリングによって、支持体マトリックス1002と“マスク”(図示せず)を密封させることができる。このマスクは、第一群の反応物液体を、予め決められたライン(チューブ)を通じて第一セットの反応領域へ送り込むのを制御する働きをする。通り込みチューブ1000、マスク、および支持体マトリックス1002を確実に密封させることによって、反応液体が偶然まちがった反応領域に加わる確率が小さくなる。

各プロセスステップの後、マスクを覚えて、新しい群の反応物を新しいセットの反応領域に送り込まれる。この方式において、組合わせ戦略を用いて、ポリマーなどの化合物の大きなアレーを作ることができる。他の実施態様では、マスク以外の機構を利用して個々の通り込みチューブを制御することができる。例えば、チューブ内の制御バルブのアレーはいくつかの実施態様に通じている。

合成支持体マトリックスの厚みを調節することによって、反応領域内に固定化される物質の量を制御することができる。例えば比較的薄い支持体合成マトリックスを使って、分析用の、表面に制御された少量のオリゴマーを製造することができ、一方比較的厚い支持体合成マトリックスを使って、その後使用するために支持体から回収させることができる比較的少量のオリゴマーを合成することができる。後者の実施態様では、個々の合成支持体に重合した寸法を有するコレクタを用いて、反応マトリックスから最終的に選別させたオリゴマーを回収することができる。

多数のポリマーを合成するこの装置の性能を示すと、各辺の長さが10cmの正方形で、5mm幅のガスケットで分離された5mm大きさの

反応領域を有する合金マトリックスは 100個の個々の合金部位（反応領域）を提供する。反応領域の大きさを任意について、2.5mmに設定させると 400個の反応領域を利用できるようになる。

本発明では、本発明の好ましい態様に直接状態を示しているが、本発明の他の実施態様では、円形リングのような円形リングなどの形が提供され、その選択されたリング面に半導体方向の溝が形成されている。いくつかの実施態様によれば、異なる幾何学的形状のチャンネルブロックを一つのステップから次のステップへと使用する。例えば第一のステップで円形リングを設け次のステップで直線ストライプを使用する。図13aは、チャンネル 408がチャンネルブロック 407中に施行した配置で配置されている。可能性のある配列の一つを示す。チャンネルブロックの適切な平行移動および/または回転によって、所望のモノマー配列のポリマーは、例えば位置 501でポリマーを連続的に増加している間にチャンネルの交差点に形成される。なお図13bは他の態様を示し、その態様では、チャンネルは（この場合図13aは）直線状の配置になっており、503と506の溝が基板の反応領域内に配置され、かつ基板の長さの一部にのみ延びている。

本発明のいくつかの実施態様では、例えば各種のモノマーを含有する各種の試薬は開口 413を通じて送る場合、ポンプでは送らない代わりに、試薬を図13bに示す溝 409のような溝の一つの中に入れてその溝を満たす。次にこの試薬をチャンネルブロックの上面の上に置いて、基板の暴露された部分と試薬中の物質と反応させる。好ましい実施態様では、チャンネルの幅は、チャンネル間の厚み出した領域の幅と同じである。これらの実施態様によれば、次に基板を一つのチャンネルの幅だけまたは一つのチャンネルの幅の整数倍、横方向に移動させて、次のキャプリングステップにおけるチャンネル間の領域とモノ

マーの反応および該領域上へのモノマーの配置を行うことができる。その後、基板もしくはチャンネルブロックは、次のシリーズのキャプリングステップを行うため回転させる。

好ましい実施態様では、このプロセスを繰返して基板の表面に10層を施える異なるポリマー配列が得られる。さらに好ましい実施態様では、このプロセスを繰返して、10°, 10°, 10°, 10°, 10°またはこれらを超える数の異なるポリマー配列が第一の基板上に得られる。いくつかの実施態様では、このプロセスを繰返して1個ほどの少数のモノマーを有するポリマーが得られるが、このプロセスは、3, 4, 5, 8, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 75, 100 またはこれらを超える数のモノマーを有するポリマーを生成するよう容易に適応させることができる。

好ましい実施態様によれば、ポリマー配列のアレーは、一つ以上の各種のスクリーニング法に利用される。そのスクリーニング法の一つは、1981年11月22日付けで出版された同時発願出願中の米国特許第 799,947号に記載されている。なおこの文献はすべての目的のために本願に引用するものである。例えば一つの実施態様によれば、その基板を、陽極もしくは陰極のような電極の受容体に暴露させる。好ましい実施態様では、受容体が結合する場所を容易に検出するように受容体にはフルオレseinで標識を付けるかまたは他の方法で標識をつける。いくつかの実施態様によれば、チャンネルブロックを用いて、受容体を含有する標識を、ポリマーの合成されたアレー上に導入する。例えばいくつかの実施態様によれば、チャンネルブロックを用いて、受容体の標識が異なる受容体の標識を基板の領域の上に導入する。

最も好ましい実施態様では、フルオレseinによる標識付けで得られたシグナルの増幅を、基板を電極の受容体に暴露し、次いで電極

の試薬に対して機械的かつ好ましくは、陽極の試薬の多数の場所に結合する標識付き物質に基板を暴露することによって行う。例えば一つの特定制の実施態様では、マウスの試薬を試験する場合、標識をつけた第二試薬を、例えばヤギ抗マウスの試薬に暴露する。このような方法は、すでに本願に引用した PCT特許公開第92/10092号に記載されている。

V. スポッティングの実施態様

いくつかの実施態様では、モノマー（または他の反応物）をディスペンサーから直接で増幅させて予め形成された領域を満たす。例えば第一のキャプリングステップで、ディスペンサーは、選択された領域がモノマーを受け取るまで、第一領域上を移動して試薬を分配し、次いで第二領域に移動して試薬を分配するなど行うことによって、一連の予め形成された領域に第一モノマーを増幅させる。次にディスペンサーは同じ方法で第二シリーズの予め形成された領域に第二モノマーを増幅させる。いくつかの実施態様では、2台以上のディスペンサーを用いるので2個以上のモノマーを同時に増幅させる。これらのモノマーは反応領域と接触して直ちに反応するか、または触媒添加のような別の活性化ステップを必要とする場合がある。いくつかの数のモノマーを、基板全体にわたって予め形成された領域に増幅させて反応させた後、未反応のモノマー溶液は基板から除去する。このようにして第一プロセスステップを完了する。

この実施態様を行うのに、基板の個々の反応領域間の間隔は好ましくは約3mmより小さく、より好ましくは約5~100 μmである。さらにこれら領域間の角度は、一貫して1°以内が好ましく、0.1°以内がさらに好ましい。基板は好ましくは少なくとも約 100個の反応領域を有し、より好ましくは少なくとも約1000個の反応領域を有

し、そして最も好ましくは少なくとも約10,000個の反応領域を有する。尚論、基板上の反応領域の密度は変化する。好ましい実施態様では基板の1辺あたり、少なくとも約1000個の反応領域があり、そしてより好ましくは1辺あたり少なくとも約10,000個の反応領域がある。

反応物の液滴を正確に指定された領域に一貫して増幅させるために、送り込み装置と基板に共通の基準の枠組（frame of reference）が必要である。換言すれば、送り込み装置の基準座標系、基板の基準座標系に正確にマッピングしておかなければならない。ポリマー領域のアレーを完全にマッピングするのに、基板上の基準点が二つしか必要でないのが理想的である。ディスペンサー装置はこれらの基準点の位置を見つけ出し次いでその内部基準座標を修正して必要なマッピングを行う。その後、ディスペンサーを特定の方向に特定の距離だけ移動させ、既知の位置に直接配置することができる。尚論、このディスペンサー装置は正確に繰返すことができる移動を行わなければならない。さらに、アレーの個々の領域は、基板に基準マークが形成された後は、このマークに対して移動させてはいけぬ。基板を製造し使用している間に通常遭遇する加圧などの機械的動作によって、あいにく、基板が曲がり、基準マークと反応領域間の対応が変化することもある。

したがって、好ましい実施態様では、“全体的な”基準マークと“局部的な”基準マークを有する基板を使用する。好ましい実施態様では、二つの全体的基準マークを基板上に配置して基準の最初の枠組を定義するのが便利である。これらの点が見つけられると、ディスペンサー装置はそこに、基板と予め形成された領域の近似位置をもっている。これらの領域の正確な位置を見つけるのを助けるために基板は基準の局部的枠組にさらに分割される。したがっ

て初期の“コース”停止時には、ディスペンサーは、一つの基準の局部伸縮率内に位置される。局部領域に位置されるとディスペンサーは、局部の基準マークを照してさらに基準の局部伸縮率を決定する。これらのことから、ディスペンサーは、モノマーが堆積される反応領域に正確に移動する。この方式では、曲がりなどの変形的作用は最小にすることができる。局部の基準マークの数は、基板に予備される変形の程度によって決定される。変形が十分に剛性であるため変形がほとんど起こらないか全く起こらない場合、ごく少数の局部基準マークしか必要でない。しかしかなりの変形が予想される場合は、さらに多数の局部基準マークが必要である。

適切な基準点を最初にみつけて、ディスペンサーをその基準点に心を合わせるため、視覚または非視覚(biased)による位置が利用される。視覚による位置では、カメラがディスペンサーのノズルにしっかりと取付けられている。カメラが基準点を見出したとき、ディスペンサーは基準点から一定の距離と方向にあることが分り基準の伸縮率が割立される。本発明の非視覚位置は、例えばキャパシタンス、抵抗または光による方法によって基準点を見つけ出す。光による方法の一例ではレーザービームを基板に通過させるかまたは基板から反射させる。そのレーザービームが基準マークに通過すると、光強度の変化がセンサによって検出される。キャパシタンスや抵抗による方法も同様に利用される。センサは、基準点に通過したときキャパシタンスまたは抵抗の変化を自動記録する。

単一の基準点で開始して、ディスペンサーは、基板の一つの反応領域から他の領域へ、正しい距離で正しい方向に平行移動する(これは“無測位置(dead reckoning)”走行(navigational)性である)。停止することにより、ディスペンサーは、正しく計量された量のモノマーを堆積させる。類似の装置は微小形の電子装置の製造および試験

の技術分野で広く利用されているが、1秒あたり3〜10回の停止までの速度で移動することができる。このような装置の平行移動(X-Y)の精度は1 μm 以内で充分である。

ディスペンサーを移動させる平行移動機構は、円ループ位置フィードバック機構(符号器)を用いたパツラッパシとヒステリシスが少くないことが好ましい。好ましい実施態様では、この平行移動機構は高分解能を有し、すなわち符号器の1カウントあたり1ミークティック(pole tick)より優れている。さらにその電気機械機構は、反応領域の底面進行距離に対して高い精度(一般に $\pm 1 \mu\text{m}$ またはこれより優れている)をもっていることが好ましい。

基板上にモノマー堆積の一端を正確に堆積させるために、ディスペンサーのノズルは基板表面上方に正しい距離を置いて位置しなければならない。一つの実施態様では、ディスペンサーの先端は、3ナノリットルの一滴を放出する場合、基板表面の上方約5〜80 μm に位置させるのが好ましい。またその一端は基板表面の上方約10 μm で放出することが一層好ましい。このような精度を達成するのに必要な制御は、上記のタイプの最適可能な高分解能の平行移動機構で達成される。一つの実施態様において、基板の上方の高さは、ディスペンサーを小インクリメントで基板に向かって、その先端が基板に接触するまで移動させることによって測定される。この時に、ディスペンサーは、特定の距離に対応する一定数のインクリメントだけ表面から移動して離れる。その位置から、一滴が下方のセルに放出される。ディスペンサーが移動するインクリメントは約3 μm 未満が好ましく、約2 μm 未満が一層好ましい。

別の実施態様では、ディスペンサーのノズルは、ディスペンサーの先端より一定距離だけ固定して延びているシースで覆われている。この延びている距離は、堆積の一端が選択された反応領域に通り込

まれるときに落下する距離に一致することが好ましい。したがって、このシースが基板表面に接触すると、ディスペンサーの移動が停止し、一滴が放出される。この実施態様では、接触が行われた後、ディスペンサーを後退させて基板から離れさせる必要はない。基板表面と接触した時は、ディスペンサー(またはシース)の先端および下方の基板間のキャパシタンスまたは抵抗を監視するような各種の方法で確認することができる。基板表面と接触した時には、これらの特性のいずれかが急激に変化することが観察される。

この点について、スポットティング装置は平行移動についてしか報告されていない。しかし他の装置も利用できる。一つの実施態様では、ディスペンサーは、電気または光による位置検出の分野で利用されているのと類似の装置によって、所望の領域に対して心を合わせが行われる。例えばモノマーを堆積させるべき領域はディスク上のトラック付きセクタの位置によって特定される。次いでディスペンサーは適切なトラックに移動させ、一方ディスク基板は回転する。適切なセルがディスペンサーの下方に位置すると(トラック上の適切なセクタによって参照されるとき)、モノマー堆積の一端が放出される。

一滴の大きさの制御は種々の方法で達成することができる。例えば、一つの実施態様では、通常の微量ピペッティング装置が5ナノリットル以下の一滴を毛細管から放出するよう構成されている。このような装置は、本発明の非真空マスクを使用する場合、直径が300 μm 以下の領域に適合している。

他の実施態様では、ディスペンサーが圧電ポンプであり、このポンプは、通常のインクジェットプリンタと類似の方式で電圧波を生成しそれを電界によって反応領域に案内する。実際にいくつかのインクジェットプリンタは、わずかに修正し、単にインクの代わり

にモノマー含有溶液を用いることによって使用することができる。例えばKongらのヨーロッパ特許第260985号(すべての目的のために本願に援用する)には、抗体を固体マトリックスに塗布するのに市販のプリンタを使用することが記載されている。このプロセスでは、抗体を含有する溶液は、溶液を別個の液滴に分割する方式で、振動している小口径のノズルを通じて吐出される。次にその液滴は電界を通過することによって同電され、次いでマトリックス材料上に向ける。

通常のインクドロッププリンタはインクを加圧下で保持する貯槽を備えている。このインク貯槽はノズルに接続されているパイプにインクを供給する。ノズルはある適切な高周波数で振動させるために電気機械式変換器を用いる。ノズルの実際の構造としては多数の異なる構造のものがあり、外部変換器によって振動させる引抜きガラス管、または外部変換器(例えば圧電結晶)で振動させる金属管、または電気ひずりで振動させる電気ひずり金属管が挙げられる。したがってインクはノズルから一つの流れて吐出され、その流れはすぐに個々の液滴に分割される。液滴に電荷を与えるためにノズルの近くに電極が置かれている。通常のインクドロップディスペンサーは米国特許第 3,281,880号および同第 4,121,222号に記載されている。なおこれらの文献はすべての目的のために本願に援用する。

異なる好ましい実施態様では、反応物の堆積が電気静力ポンプで貯槽から基板に送り込まれる。この装置では、毛細管によって、反応物の貯槽とディスペンサーのノズルが接続されている。この毛細管の両端には電極が設置され電位差が与えられている。当該技術分野では公知のことであるが、化学種が電気静力液体の電位勾配中を進行する速度は、輸送される化学種の電荷密度、大きさおよび形態を含む各種の物理特性、ならびに輸送媒体自身の物理特性と化学特

性支配される。電位印記、電泳管の手法、および輸送媒体のレオロジーの適切な条件下で、液体力学的流れが電泳管中に生成する。したがって本発明の電気泳動ポンプで、問題の反応物を含有する多量の液体が貯槽から基板上にポンプ輸送される。電気泳動ポンプノズルに対する基板の適正な位置を調節することによって、反応物の移動は、予め形成された反応領域に正確に送り込まれる。

特に有用な一つの用途で、本発明の電気泳動ポンプが、未知の反応物移動の各種の成分を含有するアレーを製造するのに使用される。例えば、基物の面または膜面等物のような生物物質由来の押出物は、受容体、リガンド、アルカロイド、核酸および生物細胞さえも含めて各種の未知の物質を含有し、そのうちのいくつかは所望の活性をもっている場合がある。このような押出物を貯槽から電気泳動によってポンプ輸送すると、含有されている各種の成分異なる速度で電泳管を通じて移動する。ポンプ輸送されるこれらの各種の成分は均一、分離できるようにいくらかの電荷をもっていなければならない。基板がディスペンサーに対して移動し、一方押出物の成分が電気泳動で分離されると、各種の別個の種を含有するアレーが形成される。次いでこのアレーは結合検定などの適正な試験法で活性について試験される。有望な活性を有するそのアレーの成分は、その後の研究でその起源からその後に分離される押出物の成分と関連がある。いくつかの実施態様では、押出物移動中の成分に例えば蛍光の標識を付ける。したがって、該移動を電気泳動ポンプで送り込んでいる間に、蛍光検出器によって、標識を付けた種がいつ基板上に移動されるか確認される。いくつかの実施態様では、その標識が、押出物中のある種の化合物と選択的に結合して、その化合物に電荷を与える。

他の適切な送り込み手段としては、浸透ポンプとセルソーター

(生物ソーター)がある。浸透ポンプは、比較的長時間にわたって定常流の移動を送り込む。このようなポンプの構造は当該技術分野では公知であり、一般に、問題の押出物の移動を浸透透過性のバッグに入れて、バッグを通過して移動する移動分子によって、浸透圧が押出物移動に加えられ、浸透圧が等しくなる。このようにして押出物を、一定の速度でノズルからバッグ中に押出す。セルソーターも当該技術分野で公知であり、単一の生物細胞を基板上の別個の位置に加えることが望ましい用途に用いることができる。

上記の実施態様は、液滴を用いる装置に関連しているものであるが、各試験物質の最少部分を微細ベレットとしてセルに送りこむこともできる。かようなベレットは、問題の化合物(例えばアフィニティー検定法に用いるリガンド)および1種以上の不活性の結合物質で製造することができる。このような結合剤の製造と微細ベレットの製造方法は当該技術分野の当業者にとって明らかである。このような「ミニベレット」は、広範囲の試験物質と検出器であり、長期間にわたって安定で、容易に貯蔵容器から取出して分配するのに適しており(すなわち、非特異的で好ましくは生体的調節剤のような液体中に溶解させることができる)、および受容体の結合活性に対して不活性である。

好ましい実施態様では、予め形成された各領域内の反応物移動は、適切なバリアーまたは閉じ込め領域によって反応領域に移動するのを防止される。例えば、モノマー水溶液を閉じこめるために、親水性物質を用いて反応領域をコートし、一方、好ましい実施態様では、親水性物質を用いて個々の反応領域を囲む領域をコートする。即ち、非水性または非極性の溶液を用いる場合、異なる表面コーティングが一般に好ましい。適切な材料(基板、親水性コーティングおよび反応物の移動)を選択することによって、液滴と基板の接触角は有

利に制御される。反応物移動と基板との接触角は大きい方が望ましい。というのはその場合液滴は比較的小きな反応領域を狭い接触角で覆らし、一方液滴はより大きな面積を覆らすからである。極端な場合、液滴は広がって全面を覆う。

接触角は、ヤングの式として知られている下記式で求められる。

$$\cos \theta = (\sigma_{11} - \sigma_{12}) / \sigma_{11}$$

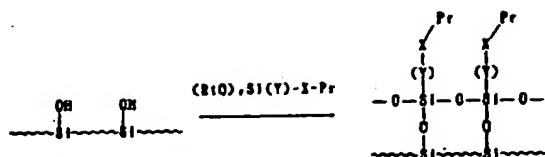
ここで θ は接触角であり、 σ_{11} は固体-空気の界面張力であり、 σ_{12} は固体-液体の界面張力であり、および σ_{21} は液体-空気の界面張力である。これらの界面張力の値は、液体と固体基板の化学成分を含む力学的事項によって支配される。各種の化学薬剤の液体-空気の界面張力は、Adamson, Physical Chemistry of Surfaces, John Wiley and Sons 社、第5版、1969年(この文献はすべての目的のため本願に適用する)に記載されているような各種の方法で容易に測定される。固体-液体および固体-空気の界面張力の値は与えられた系について、リスマン (Risman) のプロットから経験的に求めることができる。この方法では、接触角は、所定の固体表面上の同族系液体について測定される。同族系のある種の液体については「臨界接触角(critical contact angle)」が与えられ、この角度を超えると、低界面張力の液体は表面を濡らす。この臨界接触角における液体の液体-空気の界面張力は固体の界面張力であると考えられる。この方法は、テフロン、ポリエチレン、炭水化物などのような低エネルギー固体に対して極めて妥当な結果を与えることが見出されている。このような研究から得られた情報は、アレー中の所定の反応物移動についての接触角を増大するため、基板の組成を最適化するのに用いられる。

基板表面の化学組成を制御する方法、したがって基板表面の移動速度自由エネルギーの制御方法には各種の方法があるがいずれも当

該技術分野の当業者にとって明らかである。微細回路の製造に用いられる化学蒸着法などの方法は、表面の選択された領域に極めて均一な層を堆積させるのに利用できる。具体例を挙げると、シリコンウェーハの表面の蒸着性は、自己集合蒸着堆積法(self-assembled mono-layer deposition)と微細機械加工法を組合わせたマイクロメーターの尺度で測定されている(Abbott, "Manipulation of the Wettability of Surfaces on the 0.1-1 Micrometer Scale Through Micromachining and Molecular Self-Assembly" Science, 257(1992年9月4日)参照。なおこの文献はすべての目的のため本願に適用するものである)。

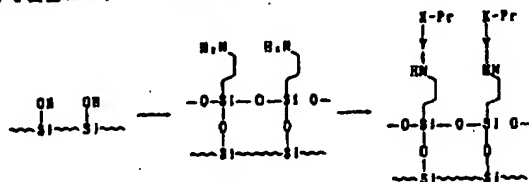
好ましい実施態様では、個々の領域の境界線が、基板表面から親水性保護基を選択的に除去することによって形成された親水性表面上に形成されている。例えば親水性光保護基の層は、例えば基板表面に結合されたリンカー分子にカップリングすることができる。次に基板表面にマスクを通して選択的に光が照射された(または例えば酸によって別の方法で活性化される)、反応領域を露出させるべき領域を露出する。この処理によって、保護基は基板表面から外され、反応領域は周囲の領域より親水性が小さくなる。この工程によって、基板表面上に高親水の反応領域が生成する。親水性物質は水よりも表面自由エネルギー(界面張力)が低いので、セル中の液滴移動は広がるよりもビーズ形になる。

いくつかの好ましい実施態様では、基板は、まず所望の反応性官能基(例えばアミン、ヒドロキシル、カルボキシル、チオなど)の層を共有結合させ、そしてその官能基は親水性の充分解離無機物で置換することによって製造される。基板がガラス面を提供する場合、上記層は以下に示すシリラン化(silanization)反応によって堆積される。



上記構造中、Yはポリメチレン鎖のようなスペーサー基であり、XはNH、C(O)O、O、Sなどのような修飾されている反応性基であり、およびPrは親水性の充分分解性保護基である。

以下に示す例の好ましい実施態様では、保護表面を、まず、例えばアミン基を修飾するのに適切なシラン化反応によって鈍体化する。次に、スペーサー、反応性基、および充分分解性基を含有する分子を表面にカップリングさせる。

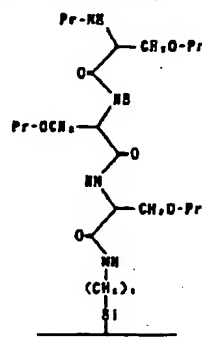


上記充分分解性保護基は、基板表面が実質的に非親水性になるよう充分に親水性でなければならない。適切なマスクを通して光に露光することによって特定の領域の保護基を除去すると、反応性官能基が露出する。これらの基は適度に親水性であるから、露出された領域の基板は親水性になる。

ニトロベンジル保護基のクラスは、ニトロベンジル基が代表的なものであるが、このクラスのものを含めたガラス表面に寄し

て親水性を与える。塩基性ニトロベンジル保護基の親水性は、基に適切な炭化水素置換基を付加することによって強化される。代表的な親水性連鎖としては、 $C_{12}H_{25}$ (ラウリル) または $C_{18}H_{37}$ (ステアリル) 置換基がある。適切に経酸化された形態 (プロキド、クロロメチルエーテルおよびオキシカルボニルクロリド) の代表的な保護基の合成を図14に図式で示す。

スペーサー基 "Y" は表面の他の親水性または親水性に寄与する。例えば、 $-(CH_2)_6-$ のような炭化水素連鎖で主として構成されているこれらのスペーサーは親水性を低下させる傾向がある。ポリオキシエチレン ($-(CH_2CH_2O)_n-$) またはポリアミド ($-(CH_2CONH)_n-$) の連鎖を含むスペーサーは、表面を一層親水性にする傾向がある。さらに大きな効果は、保護された官能基に加えて、いくつかの "マスクされた" 親水性部分を有するスペーサー基を用いることによって達成される。このことを下図に示す。



好ましい実施態様では、親水性の反応領域は、アスペクト比が1に近い (すなわち長さが高くても実質的に大きくも小さくもない) 二次元的円形などの形態である。しかし他の実施態様では、親水性領域は、上記の方式で流動する反応物を導入するのに使用される長いチャネルの形態をしている。

さらに他の実施態様では、反応領域は、例えば基板上にガスケットまたはダインプルで形成された三次元的領域である。またこのダインプルまたはガスケットは、ディスペンサーを開閉の領域に導く導路マークとして作用する。

溶液 (または反応物を送り込むのに用いる他の液体) の蒸気圧が十分に高い場合、その蒸発によって反応物の濃度が上昇することがある。検査をしない限り、この工程は溶液層を溶媒から蒸発させることになる。蒸発のこの作用は、基板の選択された領域が被覆可能である必要がないとき、その領域を密封することによって最小にすることができる。あるいは、液相と蒸気相のフガシティを等しくして蒸発を駆動する熱力学的力を減少させるように揮発性試薬の分圧を調節してもよい。試薬の分圧は、密閉チャンパー内に、揮発性試薬の比較的大きな貯槽を置くことによって増大させることができる。例えば閉鎖の条件下で蒸気圧が低い層を使用することができる。場合によって、蒸発は、逆のアレーパターンを有するフィルムまたはカバーストを用いることによってさらに制御することができる。蒸発を防止する他の方法は物理化学の技術分野では公知であり、本発明に用いることができる。

いくつかの好ましい実施態様では、蒸発は、反応領域での、部分的オリゴヌクレオチドと固定されたオリゴヌクレオチドのハイブリッド形成反応を促進するのに有利に利用される。一つの具体的実施態様では、露出で保護を付けたかまたは別の方法で保護を付けた部

的オリゴヌクレオチドの領域 (例えば酢酸アンモニウムまたは塩化マッピンゲのような塩を含有する溶液) を、固定化プローブオリゴヌクレオチドが入っている反応領域に送り込む。揮発性溶液が反応領域から蒸発すると (インクジェットプリンクによって比較されたインク領域から溶液が蒸発するのと同じ方式で)、部分的オリゴヌクレオチド: プローブオリゴヌクレオチドの濃度比が局部的に高くなり、ハイブリッド形成反応が促進される。ハイブリッド形成反応を加速する場合、反応を完了するには10分間一般時間が必要である。十分に時間をかけた後、ハイブリッドを形成していない DNA を洗い流すかまたは他の方法で蒸気から除去する。最後にプローブと部分的 DNA がハイブリッドを形成した領域を抽出するため検出化 (image) する。勿論、蒸発は、ハイブリッド形成反応以外の各種の反応において非 DNA 層質の局所濃度を増大するのに有利に利用することができる。例えばいくつかの実施態様では、受容体の溶液は充分に揮発性なので、例えばスクリーニングされるべきペプチドを含有する反応領域において、局所の受容体濃度が増大する。

上記のスポットティングの実施態様によって製造したアレーは、一般に、先に述べたフローチャネルの実施態様によって製造したアレーとは異同に使用される。例えばスポットティングの実施態様によるアレーは、先に本欄に引用した PCT特許公開第9091/10991号に記載されているようなフルオレセインで標識を付けた受容体によるスクリーニングに利用できる。

VI. 別の実施態様

本発明のいくつかの実施態様によれば、基板上の選択された領域によってチャネルを形成するのに、マイクロバルブ構造体が使用される。これらの実施態様では、マイクロバルブのアレーが形成され、このアレーは、その上方または下方に存在し、選択されたバルブを

付勢してバルブを開閉するのを用いる電磁のアレーによって駆動される。

図15はこのような構造体を示し、図15aはその断面を断面図で示し、そして図15bはその断面を平面図で示す。こゝに示す構造体は、明快にするため二つの合成チャンパーしか描いていないが、大部分の実施態様でははるかに多くの数のチャンパーが設けられている。マイクロバルブは、例えばSchlichの米国特許第4,998,848号およびSautti, "Advanced Silicon Microstructures", ASCT Conference 1989年に詳細に開示されている。なおこの開文はすべての目的のために本願に引用する。

図15に示すように基板802は、写真平版法または他の開示する法を用いて形成した複数のチャンネル804を描いている。これらのチャンネルは合成チャンパー808にまで到達している。各チャンネルの末端にバルブ構造体806がある。図15に示すように、チャンネルは合成チャンパーまで到達しているが、バルブによって該チャンパーから開閉することができる。多数のバルブを各チャンパーに設置してもよい。図15に示す特定の構造では、左側のチャンパーの右側のバルブと右側のチャンパーの左側のバルブは開いているが、その外のバルブは閉じている。したがって試薬は、基板の上面に送り込まれると、開いたチャンネルを通じて左側のチャンパーに流入して通過すると、右側のチャンパーを通過しない。したがってカップリングステップは、上記の方法を用いて、選択されたチャンパーに導入された選択された試薬によってチャンパー上で行われる。

いくつかの実施態様では、一つのバルブがチャンパー808の一方の側に設けられ、その対向する側のバルブは半導体で代替されている。これらの実施態様では、選択された試薬をチャンパー808に流入させ、その後もう一つの選択された試薬を、半導体に隣接するフ

ローチャンネルを通じて流入させることが可能になる。この半導体は、一方の側または他方の側の物質の一部を膜を通して通過させることができる。このような実施態様は例えばキルの研究に有用である。

スクリーニングは、例えば複数の二つの半導体部分を分離または切断し、例えばフルオレseinで膜を付けた試体などと接触させてスクリーニングができるようにし、次いで光で検出することによって実施される。

図18aと18bは、本願で開示した機械的ポリマー合成法および光化学合成法を組合わせた本発明の例の実施態様を示す。これらの実施態様では、基板401は図18aにストライプとして示す選択された領域に光が照射される。基板の表面には、例えばペブテド合成の具体例のアミン基にPCT特許公開第9092/10092号(すでに本願に引用した)にしたがって結合された光感受性基(photoresolvable group)が付与されている。このステップの間に、基板の領域701、702および703は特に保護膜され、基板の残りの領域は、ニトロベラトリルオキシカルボニル("NVO")のような光感受性基で保護されたままで残っている。本発明の具体的実施態様では、基板の光を照射された領域の幅は、保護された領域の幅に等しい。

次いで、図18bに示すように、基板にチャンネルブロック407を塗布させる。図18bに示す特定の実施態様では、チャンネル704、705および707はそれぞれ、基板401上の領域701、702および703と一列に並んでいる。明らかにように、本発明の具体例では、ストライプの形での光照射領域と、チャンネルがあり、このステップで両者が一列に並べられる。しかし他の実施態様では、他の形での光照射領域とチャンネルおよび他の相対的方向の光照射領域とチャンネルが提供される。チャンネルブロックと基板は、例えば基板とチャンネルブロックの両者につけられた心出しマークによって一列に並べられる。基板

は、例えば減圧チップ(Vacuum tip)によってチャンネルブロック上に配置される。

その後、選択された試薬をチャンネルブロック中のチャンネルを通じて流入させるかまたは該チャンネル中に入れて、すでに光に暴露した領域にカップリングさせる。先に述べたフローチャンネルの実施態様と同様に、チャンネルブロックの基板に対する圧縮およびポンプ抽送中のデッドスポットを避けるため、いくつかの実施態様では、基板は、予め定義されたチャンネルブロックと接触させる。本発明の好ましい態様では、例えばモノマーA、BおよびCを含有する試薬のような異なる試薬が各チャンネル701、702および703を流動する。次いでこの工程では任意に、基板を例えば一つのチャンネルの幅だけ平行移動させて、先のチャンネルの間の領域にモノマーをカップリングさせる第二のカップリングステップが行われる。

次いで光を照射し次いでチャンネルブロックでカップリングを行う工程をまだ繰り返していない領域で繰り返す。次いでこの工程を、マスクのストライプと例えば91°回転させたチャンネルブロックで再度繰り返すのが好ましい。このカップリングステップにおいて、マスクと基板を適切に平行移動しかつ適切なマスクを選択することによって、基板の選択された領域に多数なモノマー配列を有するポリマーが生成する。本願に開示された光化学法と機械的フローチャンネル法を組合わせることによって、多数な配列を形成する際の一層大きな効率が達成される。というのは、単一の光照射/カップリングステップで多数のモノマーがカップリングされるからである。

光化学法では、マスクを通して見える光が、マスクの暗領域の領域のまわりで種々の程度に照射される。したがって"暗"領域の領域において感光性樹脂の露光しくない除去がいくらか起こる。この作用は、マスクの平行移動とこれに続く露光を繰り返すことによ

って悪化し、結局、予め形成された領域の端部に不均一な合成部位をもたらすことになる。この作用は勿論、ガラス基板の厚みおよび光が照射される角度に左右される。マスクが基板の"裏面"に配置されている場合、図9aの2.5°および基板の厚み0.7mmの場合、各領域の端部に照して約50μmの光の帯(多数な領域を有する)を生成する。0.1mmの基板の場合、光の帯の幅は約5μmになる。

図9によるこのような"ブリードオーバー"作用("bleed-over" effect)を減らすために、基板の反応領域を活性化および/または形成するのにピンホールマスクを利用する。すなわち、例えばピンホールマスクを通して見える光を光感受性樹脂を含有する基板にあてる。次いでこの光を照射された領域の基は除去され、親水性の反応領域が形成される。一つの具体例では、ピンホールマスクが印通の円形の通孔を有し、その通孔は直径と間隔が固定され、例えば直径が20μmで間隔が50μmである。いくつかの好ましい実施態様では、定置ピンホールマスクが、基板およびPCT特許公開第9092/10092に記載されているタイプの平行移動マスクの間にサンドイッチされている。この方法によれば、基板の選択された領域はブリードオーバーなしで活性化されてポリマー合成を行うことができる。上記の平行移動マスクは定置ピンホールマスクの選択された通孔に光を当てるために用いられ、そしてその端部は平行移動マスクの通孔の間隔距離を分析し(dissect)その結果、近くの部位を光保護基が照射によって除去されることがない。ブリードオーバー入射光は無視できる程度であるから、端部にそって並んでいる部位における不均一な合成はなくなる。得られた円形部位には、勿論、ピンホールマスクの端部における照射によって種々の配列密度が含まれているが、予め形成された各領域における配列は均一である。それに加えて、各合成領域は、基板が活性化領域でプローブされている

場合、「暗」領域で図られている。したがって、ブリードオーバーなしの蛍光シグナルが、近くの部位に結合することによって導入される。

厚さが20μmで間隔が10μmの円形通孔を有するピンホールマスクは、オリゴヌクレオチドの完全セットを得るのに必要な金合金膜厚は、1.75nmに過ぎない。所定のピンホールマスクに対して、薄い基板を使うと、間隔を大きくしたより小さな反応部位が得られる。しかし、小さい部位を用いると、信頼性の高いデータを得ることができない。反応部位の密度は輪周、圓所角、およびピンホールマスクと反応領域の距離（一般に基板の厚み）によって決定される。

これまでの考察は円形ピンホールに集中していたが長方形、四角形、三日月形などの他の形でも、選択された通り込み部にに対して適切であれば利用できる。したがっていくつかのフローチャネルの実験結果に対しては直線状またはS字形の長さが望ましい。

別の好ましい実験結果において、ピンホールマスクは基板の上にコートされた層の形を有している。このようにすることによって、ドットパターンを生成させるのに別の定義マスクを用いる必要がなくなる。さらに、この膜厚は、上記のスポットニングの実験結果にしたがって反応物を体積させる際の、明確な金成膜厚を提供する。さらに、真鍮ピンホールマスクは、モノマー溶液を上記のように適正な領域に通り込むため用いられる金行装置で用いられる局所基板上で便利にエンボス加工される。好ましいピンホールマスクはクロムのような不透明または反射性材料で製造される。

VI. 実験例

A. 実験結果

最初の実験は、溶液を基板の選択された場所に通り込み他の領域

に接触しないよう限定するフローチャネル構造を用いて実施した。さらにその実験は試薬を同じ方式で送り込めることを示すのに利用した。

したがって、約42mm×42mmの寸法の通常のガラスの平板をアミノプロピルトリエチレシランで関数化された。金スライド (active slide) を通常の方式を用いて脱脂液を行って洗浄した。厚さが1mmで幅が1mmの10本のチャネルを備えたK1P81製ブロックを基板に接触させたときに形成されたフローチャネルに、FITCのフルオレセインマーカを導入した。フルオレセインマーカは 10³倍濃度であり、手動ピペットで滴に注入することによってチャネルを通じて流入させた。

同様にフルオレセイン染料を、ブロックの他のすべてのチャネルに注入し、ブロックを脱脂し改めてこの処理を繰り返した。蛍光強度：位置の得られると予想されるプロットを図17に図式で示す。暗領域は垂直方向と水平方向のストライプの交差点に見られ、一方薄いグレー部分はストライプの交差していない部分に見られる。その暗グレー領域は高染料濃度の予想領域を示し、一方薄グレー領域は低染料濃度の予想領域である。

マッピングは、PCT特許公開第9032/10002号（すでに本願に引用した）の方法によって、収集した強度データを用い、実際のスライド (actual slide) の部分の蛍光強度で行った。結果は予想した結果とよく一致し、チャネルの交差部分は高い蛍光強度を示し（ストライプの交差していない部分より約30%高い）、かつチャネルの他の領域は低い蛍光強度を示した。蛍光染料に暴露されなかった領域は暗性をほとんど示さず、良好なS/N比を示している。交差部分はバックグラウンドの約8倍もの高い蛍光強度を有している。またチャネル内の領域は蛍光強度の変動が少なく、このことはチャネ

ル内のこの領域が均一に処理されていることを示している。

B. YGGFL の形成

上記装置を使用し、以下の4種の異なるペプチドを合成した。すなわちYGGFL (SEQ. ID No. 1)、YpGFL (SEQ. ID No. 2)、pGGFL (SEQ. ID No. 3)、およびppGFLである（なおこれらの略語はききに本願に引用したStryer, Biochemistry, 第3版, 1985年に記載されている。小文字はD-光学異性体を示し大文字はL-光学異性体を示す）。金ガラス基板を、FMOCで保護されたアミノプロピルトリエチレシランで関数化し、TPAで脱保護を行い、FMOCで保護されたカプロン酸（リンカー）でコートし、ピペリジンで脱保護を行い、次いでFMOCで保護されたグリシン-フェニルアラニン-ロイシン(GPL)でコートした。

このFMOC-GPLでコートしたスライドをチャネルブロックに密着させ (seal)、次いで10本の溝すべてを、DMF中のピペリジンで脱保護を行った。溝を洗浄した後、FMOCグリシン (G) を偶数番号の溝に注入し、FMOC イープロリン (P) を奇数番号の溝に注入した。標準のカップリング化学反応を用いて2時間カップリングを行った後、すべての溝をDMFで洗浄した。これらの溝を減圧乾燥し、ブロックを外して90°回転させた。再び密着させた後、すべての溝をDMF中ピペリジンで脱保護し改めて洗浄した。FMOCチロシン (Y) を偶数番号の溝に注入し、次いでFMOC Pを偶数番号の溝に注入した。カップリングを行った後、これらの溝を洗浄し、減圧乾燥した。したがって各化合物 YGGFL, YpGFL, pGGFLおよびppGFLの25の領域が基板上に合成された。この基板を外し、FITCの標識をつけた抗体 (Her2抗体327) でスタイン (stain) した。

得られたスライドは強い蛍光の明るい領域を示した。白い四角部分は YGGFLの領域内にある。最も暗い領域は pGGFLと ppGFLである。

YGGFLの部位は最も強度が高く、YpGFL部位がこれに続いていく。pGGFLとppGFLの強度はバックグラウンドのレベルに近く、Her2抗体に対する予想結果と一致している。

実験結果を定量的分析したところ、YGGFL: YpGFL: pGGFL: ppGFLの金強度比が1.7: 1.5: 1.1: 1.0であることを示している。しかし YGGFLと YpGFLについては標準偏差が大きいため、すべての部位を互いに比較しても、実際のコントラストを正確には示さない。同じ「ストライプ」内の部位の強度を比較すると大きなコントラストが得られるが、そのコントラストは2: 1のオーダーのまゝである。

C. 100ミクロンのチャネルブロック

基板にカップリングさせたイソチオシアン酸フルオレセインのグリッドパターンを本発明のフローセルを用いて作製した。2インチ×3インチのNYOC関数化基板をマスクを通して充分分解を行い、一つの軸線上に400ミクロンの活性化されたバンドを生成させた。100ミクロンの間で分離された84本の平均の100ミクロンチャネルを有する、エッチングされたシリコンチャネルブロックを、他の軸線上で（すなわち400ミクロンの活性化バンドの軸線に垂直に）基板にクランプした。アルミニウム製の上部と下部のクランププレートからなるクランプ装置を使用した。圧力は、2本のボルトをトルクレンチで締付けることによって400psiまで加えた。7mmのイソチオシアン酸フルオレセイン領域を、暴露されたチャネルの端部に直接ピペットで入れることによってチャネルを通じて流入させた。

基板の画像 (image) は、フルオレセインが基板に結合したことを示す強い蛍光の領域を示した。フルオレセインの結合を示す白色の領域が、100ミクロンの間隔領域内の充分な領域上の400ミクロン水性ストライプとして認められた。チャネルおよびチャネル間の部

分のコントラスト比は1:1であった。このことは400psiのクラッピング圧下で、100ミクロンチャネルを通過する液体がほぼ完全に物理的に分離されていることを示している。

D. チャネルマトリックスのハイブリッド形成装置

2インチ×3インチのスライドの中央領域をピストン（3-ヒドロキシエチル）アミノプロピルトリエトキシランで固体化した。次に8個のメタレオレドを、加えられるモノマーに対して、既述のキャッピング、および酸化のステップからなる合成工程を用い、全反応領域にキャッピングさせた。これらの最初の8個のメタレオレドは、2インチ×3インチのスライドにクラップされたアルミニウム膜の直径0.84インチの円形ウェルで形成された反応領域にキャッピングさせた。

7番目と8番目のモノマーは、モノマー溶液を、エッチングしたシリコンチャネルブロック（上記実施例Cで利用した）の100ミクロンチャネルを通じて投入させて基板に塗布した。7番目の塩基は、2インチ×3インチのスライドの長軸（垂直）にそってキャッピングさせ、次いで8番目の塩基を、7番目の塩基に対して直角にスライドの短軸（水平）にそってキャッピングさせた。このようにして、1cm²あたり2500個の反応領域の密度を有する1.28cm×1.28cmの塩基マトリックス領域を形成した。

チャネルブロックを反応領域上の中央に置いて、機械加工がなされたアルミニウムプレートからなるクラッピング装置を用いて基板にクラップした。このようにして、2インチ×3インチの基板をチャネルブロックに対して所望の方向に配向した。7番目と8番目のキャッピングステップの間で、上記クラッププレートとチャネルブロックを、下部クラッププレートと基板に対して回転させて、交差する縦列と横列のマトリックスを得た。

ブリッドが生成したことを示した。画像の垂直方向のストライプは、交差領域における明るさが著しく高い領域と一致する明るさを示した。水平方向のストライプは垂直方向のストライプの一貫した明るさをもっていなかったが垂直方向のストライプとの交差部では明るい領域を示した。7番目のモノマーの軸線（垂直方向）に沿った一貫した明るさは、八つの個別的塩基のうちの七つが基板表面にキャッピングした領域において個別的塩基が部分的にハイブリッドを形成することを示した。8番目のモノマーの軸線（水平方向）にそって明るさが欠如していることは、基板表面に塗布された8個のマッチング塩基(matching base)の塩基は溶液中の八量体と有効にハイブリッドを形成しない（8個のマッチング塩基を有し7位にミスマッチを有する七量体）という予想と一致している。一層暗いバックグラウンドは、全反応領域にキャッピングされた最初の8個のモノマーからなる六量体で構成されている。

例 2

上記の説明は本発明を例示して説明しているが本発明を限定するものではない。本発明の多くの変形は本発明の開示を見れば当該技術分野の当業者によって明らかになるであろう。例えば、基板、受容体、リガンドなどの物質については各種のものを、本発明の適用範囲から逸脱することなく使用することができる。それ故、本発明の適用範囲は、上記説明によって決定されるべきではなく、本願の特許請求の範囲とその均等物によって決定されるべきである。

上部クラッププレートにおいて、液体送り込みウェルを、チャネルブロックの背面から個々のチャネルに入るレーザーであけた孔に接続した。これらの送り込みウェルは、チャネルブロックが基板にクラップされている間に、キャッピング装置をチャネルにピペットで分配するのに用いた。対応する液体送り込みウェルをチャネルブロックの下流で流注部に接続し、液体をチャネルを通じて引出し排液導管に入れた。したがって、キャッピングステップ中は、チャネル領域の基板表面上には連続して液体が流動している。

7番目と8番目のキャッピングステップによって形成されたチャネル交差部において合成された完全な八量体は下記の配列をもって

基板--(5')GGCAGCCG(5') (SEQ. ID No. 4)

合成工程を完了した後、反応領域を過酸化アンモニウム溶液中に浸漬することによって、過剰アミンの脱離を行った。次にその反応領域を、特約的な塩基配列：5'-GCCTCCGC-P(SEQ. ID No. 5)（配列中、「P」はオリゴヌクレオチドの3'末端にキャッピングされたフルオレセイン分子である）の10mM溶液中で、15℃にて1時間インキュベートした。次にやはり15℃にて、個別的塩基の溶液を反応領域からフラッシュし、純粋の8×8PF8塩基液で置換した。最後に、上記置換溶液中に浸漬しながら、反応領域を、レーザー光照射装置を用いて食した。

得られた画像中最も明るい領域は、完全な八量体が基板表面上に合成されたチャネル交差部に存在している。画像の垂直列は、7番目の塩基がキャッピングしたチャネル領域を示し、一方水平列は8番目の塩基がキャッピングされたチャネル領域を示す。チャネル交差領域の明るさが、フルオレセインで標識を付けた個別的塩基と、これらの領域内で合成されたその塩基に隣接された個別的塩基とのハイ

配 列 表

(1) 一般情報：

(i) 出願人：ウイックラー、ジュイムズ エル。

フォーダー、ステファン ビー、エー。

バクコ、クリスティーナ ジェイ。

アルドウィン、ロイス

キドリ、ダグラス

(ii) 発明の名称：ポリマー合成に対する組合わせの装置

(iii) 配列の数：5

(iv) 塩基の優先：

(A) 受容体：バーノン エイ、ノルビール

(B) ストリート：スイート2000、スチュアート・タワー。

ワン マーケット プラザ

(C) 市：サンフランシスコ

(D) 州：カリフォルニア

(E) 国：米国

(F) ZIP：94105

(v) コンピュータが読取ることができる形式：

(A) 媒体の種類：フロッピーディスク

(B) コンピュータ：IBM PC Compatible

(C) オペレーティングシステム：PC-803/MS-803

(D) ソフトウェア：Patent In Release 81.0.

Version 81.25

(vi) 本出願のデータ：

(A) 出願番号：PCT

(B) 出願日：

(C) 分 限：

(4) 願出願のデータ:

(A) 出願番号: US 07/796,243

(B) 出願日: 1991年11月22日

(C) 分類:

(4) 発明士/発明士の情報:

(A) 姓名: ウィーバー, シュフリー ケイ.

(B) 登録番号: 31,314

(C) 参照/名称番号: 11509-39-1

(4) 電気通信の情報:

(A) 電話: 415-326-2800

(B) テレファックス: 415-326-2422

(2) 配列番号: 1 の情報:

(1) 配列の特徴:

(A) 長さ: 5 個のアミノ酸

(B) 種類: アミノ酸

(C) 鎖の数 (STRANDSNESS): 一本鎖

(D) トポロジー: 線状

(2) 分子の種類: ペプチド

(3) 配列の表示: 配列番号: 1:

Tyr Gly Gly Phe Leu

(2) 配列番号: 2 の情報:

(1) 配列の特徴:

(A) 長さ: 4 個のアミノ酸

(B) 種類: アミノ酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 線状

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 線状

(2) 分子の種類: DNA(プライマー)

(3) 配列の表示: 配列番号: 5:

GGCGCCGC

(2) 分子の種類: ペプチド

(3) 配列の表示: 配列番号: 3:

Tyr Gly Phe Leu

(2) 配列番号: 3 の情報:

(1) 配列の特徴:

(A) 長さ: 4 個のアミノ酸

(B) 種類: アミノ酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 線状

(2) 分子の種類: ペプチド

(3) 配列の表示: 配列番号: 3:

Gly Gly Phe Leu

(2) 配列番号: 4 の情報:

(1) 配列の特徴:

(A) 長さ: 8 個の塩基対

(B) 種類: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 線状

(2) 分子の種類: DNA(プライマー)

(3) 配列の表示: 配列番号: 4:

GGCGACGC

(2) 配列番号: 5 の情報:

(1) 配列の特徴:

(A) 長さ: 8 個の塩基対

(B) 種類: 核酸

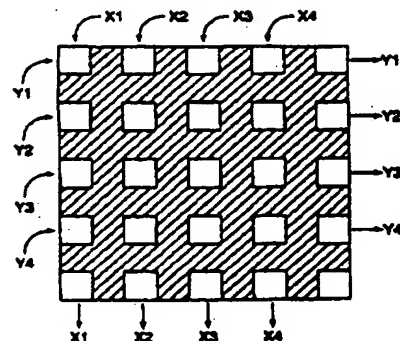


FIG. 1

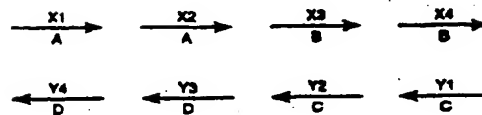


FIG. 2

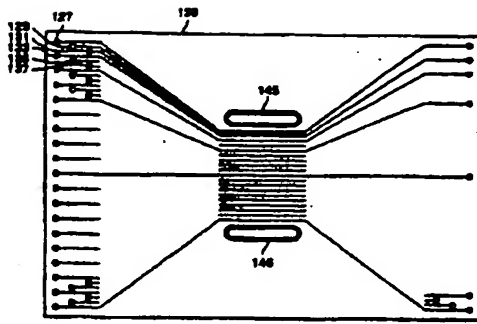


FIG. 7A

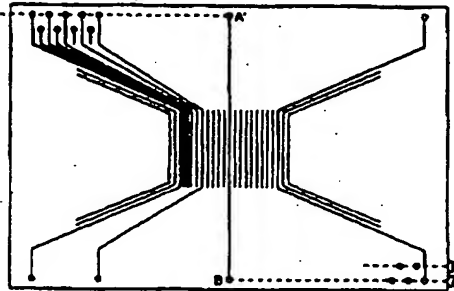


FIG. 7B

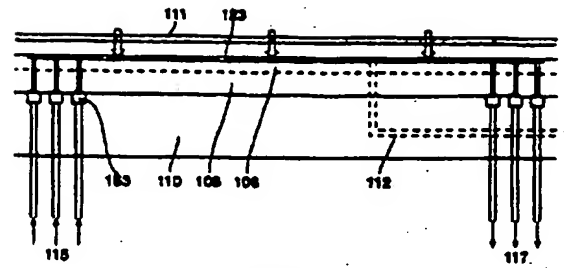


FIG. 8

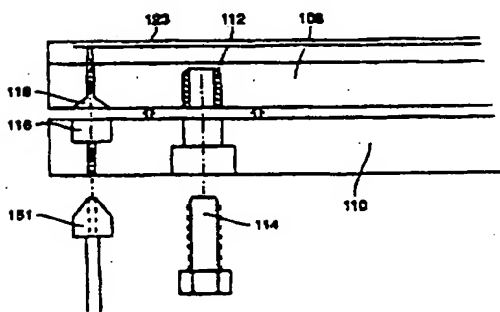


FIG. 9

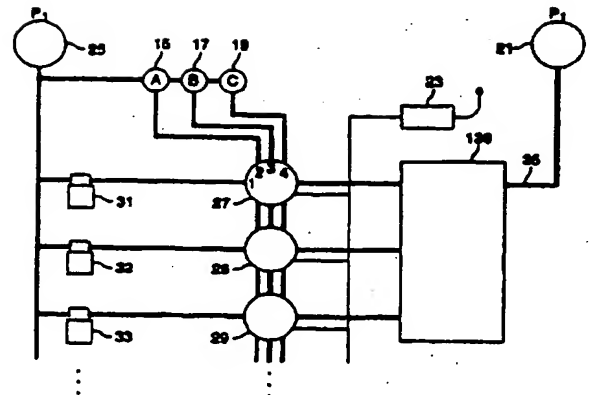


FIG. 10

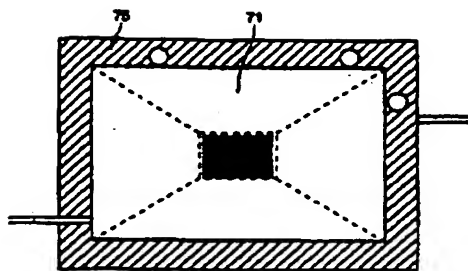


FIG. 11A

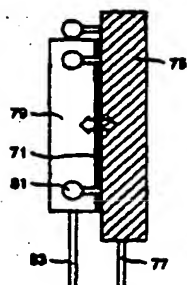


FIG. 11B

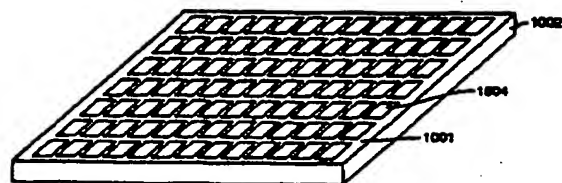
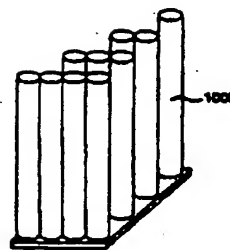


FIG. 12

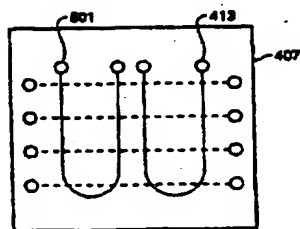


FIG. 13A

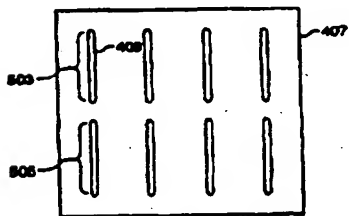


FIG. 13B

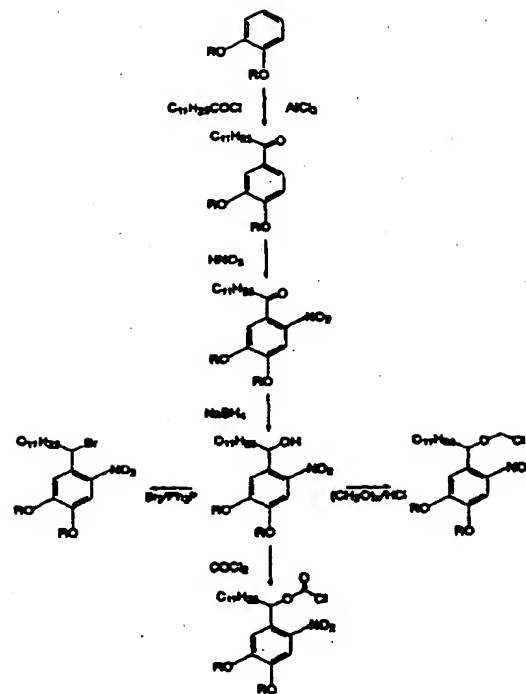


FIG. 14

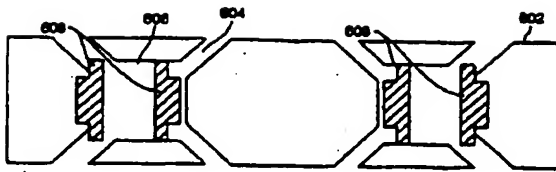


FIG. 15A

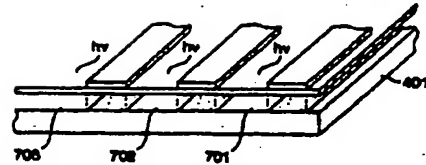


FIG. 16A

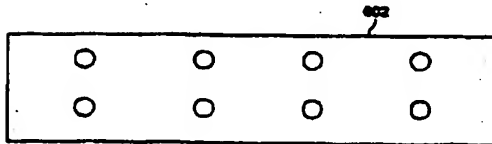


FIG. 15B

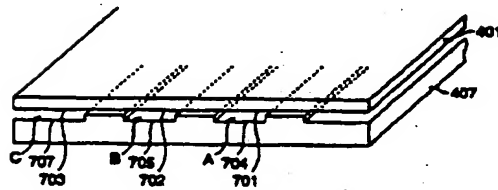


FIG. 10B

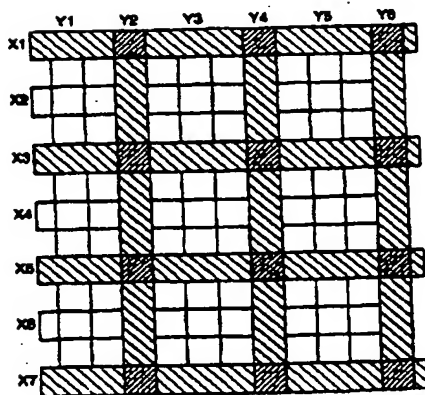


FIG. 17

[illegible]

For 1973-74, the percentage of total revenue from

1992

FI

(72)発明者 ロス、デブラ エー。
アメリカ合衆国、カリフォルニア 94536,
フレモント、ブリッジウッド テラス
3419, #302

(72)発明者 アルドウィン、ロイス
アメリカ合衆国、カリフォルニア 94402,
サン マテオ、レイクショア ドライブ
179

(72)発明者 モドリン、ダグラス エヌ。
アメリカ合衆国、カリフォルニア 94306,
パロ アルト、スクリップス アベニュー
4083